



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA



ANDERSON CARLOS SILVA ROCHA

ANTAGONISMO *IN VITRO* DE FUNGOS ENDOFÍTICOS,
ISOLADOS DE *HEVEA BRASILIENSIS*, CONTRA O
MICROCYCLUS ULEI (FUNGO CAUSADOR DA DOENÇA
SUL-AMERICANA DAS FOLHAS DA SERINGUEIRA)

Feira de Santana, BA
2007

ANDERSON CARLOS SILVA ROCHA

**ANTAGONISMO *IN VITRO* DE FUNGOS ENDOFÍTICOS,
ISOLADOS DE *HEVEA BRASILIENSIS*, CONTRA O
MICROCYCLUS ULEI (FUNGO CAUSADOR DA DOENÇA
SUL-AMERICANA DAS FOLHAS DA SERINGUEIRA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Trovatti Uetanabaro
Co-orientador: Prof. Dr. Dominique Garcia
Co-orientador: Me. Carlos Mattos

Feira de Santana, BA
2007

Aos meus pais Clóvis e Marinalva,
pela base e cuidados para a minha
formação.

DEDICO

À Graziela, pela paciência nos muitos
momentos de estresse, e, sobretudo, por
superar as dificuldades com a minha
ausência e cuidar do nosso filho
Guilherme.

À todos que me apoiaram
incondicionalmente e torceram para o meu
sucesso.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir a minha existência e por estar sempre ao meu lado, e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, de forma especial:

Ao Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto, pela orientação e preciosas cargas de otimismo. Realmente foi uma honra desenvolver este trabalho sob sua orientação e integrar seu grupo de pesquisa.

À Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro, pela exaustiva dedicação ao trabalho e compreensão nos momentos mais difíceis. Sua confiança e objetividade foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Dominique Garcia, por toda a colaboração e valiosas sugestões ao trabalho, e pela admiração e respeito que ficaram.

À PMB- Plantações Michelin da Bahia, especialmente: ao pesquisador Carlos Mattos, pelo apoio indispensável e acolhimento nas instalações da PMB; ao amigo Luciano pelos dias de Domingo dedicados e convivência divertida e solidária e, não menos especial, aos amigos Saulo e Neto, pelo auxílio técnico e pela amizade e respeito que se firmaram. Tenham todos o meu sincero reconhecimento.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) pela organização e apoio acadêmico.

A minha grande amiga Catiane pelo Big-Mega-Ultra-Super apoio, carinho e incentivo para tudo dar certo, nos momentos mais difíceis do meu trabalho. Já me considero vencedor em ter você como amiga. Obrigado por tudo!

Aos meus colegas do PPGBiotec, em particular aos meus queridos amigos Bruno, Wagner e Indira pelo convívio divertido e constante incentivo e companheirismo.

À Marcela, pelas inúmeras noites de purificação dos isolados.

À minha amiga Isabella. Tenho tanto que te agradecer! Acho que isso daria mais de uma página. Mas em resumo, te agradeço pelas noites e finais de semana dedicadas, pelo carinho e compreensão nas horas difíceis, por todo empenho e disciplina nas tarefas do laboratório Tenho a ti um profundo respeito e gratidão. Muito Obrigado por tudo!

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da UEFS, especialmente Suiknai e Paulo, pelas dicas e boas conversas, e Carla pela competência profissional durante a liofilização dos extratos brutos.

À Rita pela exaustiva dedicação em me ajudar na extração e amplificação das amostras de DNA dos fungos.

Ao amigo e secretário da pós-graduação Helton, pelas informações e inúmeros auxílios prestados.

À Loise pelas valiosas dicas e o material bibliográfico cedido.

Aos amigos Delio Barbosa e Carlos Fabbrício, por acompanharem a minha luta em todos esses anos e compreenderem a importância deste trabalho para mim. Ofereço a vocês o meu profundo agradecimento.

A Sônia Curvello pela eficiência na compra de materiais de consumo para a execução do trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo auxílio financeiro para a execução do projeto.

“Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez 100 vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as que vieram antes”.

Jacog Riis

RESUMO

Fungos endofíticos são todos aqueles que habitam, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, o interior de uma planta em associação simbiótica. Estes microrganismos desempenham um papel importante para a defesa das plantas, podendo ainda constituir fontes promissoras para obtenção de valiosos produtos naturais bioativos. O presente trabalho teve como objetivo selecionar fungos endofíticos antagônicos ao fitopatógeno *Microcyclus ulei*, isolados de três variedades de *Hevea brasiliensis* (FX3864, CDC312, MDF180) com diferentes níveis de resistência ao ataque deste fungo. O *M. ulei* é o agente causador da doença sul-americana das folhas da seringueira (SALB – South American Leaf Blight), um dos maiores responsáveis pelas perdas na heveicultura do Brasil. Amostras foliares de 15 indivíduos (cinco por variedade) foram coletadas em uma área de 5.000 hec., pertencente a Plantações Michelin da Bahia (PMB), localizada no município de Igrapiúna, sudeste baiano. Foram isolados, purificados e preservados 435 fungos endofíticos. Extratos brutos obtidos a partir de 88 fungos foram testados *in vitro*, nas concentrações de 50% e 12,5%, contra a germinação de conídios das variedades fisiológicas de *M. ulei* PMB26 e PMB28, dos quais 15 apresentaram inibição acima de 80% sobre os conídios das duas variedades testadas. Os fungos cujos com extratos apresentaram atividade inibitória significativa, identificados por métodos moleculares, foram *Fusarium* sp., *Glomerella cingulata*, *Phomopsis* sp., *Myrothecium* sp., *Pestalotiopsis* sp e *Microdiplodia* sp. O presente trabalho constitui o primeiro estudo sobre atividade inibitória de fungos endofíticos de seringueira contra o *M. ulei*.

Palavras-chave: Antagonismo *in vitro*. Fungos endofíticos. *Hevea brasiliensis*. *Microcyclus ulei*.

ABSTRACT

Endophytic fungi live inside plants in a symbiotic association for at least a period of their life cycle. These microorganisms play an important role in plant defense and could be promising sources of valuable natural bioactive products. The present study aimed to select endophytic fungi that are antagonistic towards the phytopathogen *Microcyclus ulei*. These endophytic fungi were isolated from leaves of three varieties (FX3864, CDC312, MDF180) of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) with distinct resistance levels to the attack of *M. ulei*. *M. ulei* is the agent of South American Leaf Blight (SALB), a disease responsible for significant losses in rubber tree production of Brazil. Leaf samples of 15 individuals of rubber tree (five per variety) were collected in an area of 5.000 ha in Plantações Michelin of Bahia (PMB), located in the municipality of Igrapiúna, in the southeast of the State of Bahia. A total of 435 endophytic fungi were isolated, purified and preserved in sterilized distilled water. Gross extracts obtained from 88 endophytic fungi were tested *in vitro*, in the concentrations of 50% and 12,5%, against the germination of conidia of the physiological varieties of *M. ulei* (PMB26 and PMB28). A total of 15 endophytic fungi presented inhibitory activity above 80% against conidia of the two *M. ulei* varieties tested. Endophytic fungi with extracts exhibiting significant inhibitory activity were identified by molecular methods and correspond to the following taxa: *Fusarium* sp., *Glomerella cingulata*, *Phomopsis* sp., *Myrothecium* sp., *Pestalotiopsis* sp and *Microdiplodia* sp. The present work constitutes the first study about inhibitory activity of rubber tree endophytic fungi against *M. ulei*.

Keywords: *In vitro* antagonism. Endophytic fungi. *Hevea brasiliensis*. *Microcyclus ulei*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de fungos endofíticos em associação com o hospedeiro	20
Figura 2. Metabólitos secundários de fungos endofíticos	29
Figura 3. Ciclo de vida do <i>M.ulei</i> na seringueira	35
Figura 4. Sintomas da SALB na lâmina foliar de <i>Hevea brasiliensis</i> (linhagem CDC 943)	36
Figura 5. Fluxograma da metodologia empregada no presente trabalho	39
Figura 6. Coleta das amostras foliares	42
Figura 7. Amostras foliares selecionadas de um indivíduo da variedade MDF180 de <i>H. brasiliensis</i>	43
Figura 8. Desinfecção superficial dos folíolos de <i>H. brasiliensis</i> - Tratamento químico com hipoclorito de cálcio a 3% m/v	44
Figura 9. Corte do ápice e da base de um folíolo	44
Figura 10. Extrato foliar macerado com 5,0 mL de solução tampão fosfato de sódio a 0,5M em condições assépticas	45
Figura 11. Extrato foliar sendo espalhado assepticamente sobre o meio BDA, suplementado com cloranfenicol (100 µg/mL) e rosa de bengala (25 µg/mL), com auxílio de uma alça de Drigalski	45
Figura 12. Preservação e manutenção dos fungos endofíticos isolados de <i>H. brasiliensis</i> em tubos de vidro lacrados (segundo Castellani, 1967)	46
Figura 13. Produção e processamento do extrato bruto	49
Figura 14. Produção de esporos assexuados do <i>M.ulei</i> PMB26	51
Figura 15. Teste de germinação	54
Figura 16. Comportamento das colônias em placas de isolamento após um período determinado de incubação em B.O.D. a 28°C	60
Figura 17. Fungos endofíticos isolados de <i>Hevea brasiliensis</i> , purificados em meio BDA e mantidos em B.O.D. a 28°C por um período de 7 a 10 dias	62
Figura 18. Efeito do Extrato de Malte na germinação de conídios das variedades fisiológicas de <i>M.ulei</i> PMB26 e PMB28	68
Figura 19. Curva de inibição dos resultados dos 88 testes de germinação de esporos de <i>M.ulei</i> PMB26 em presença de extratos brutos na concentração de 50%	71

Figura 20. Curva de inibição dos resultados dos 88 testes de germinação de esporos de <i>M. ulei</i> PMB28 em presença de extratos brutos na concentração de 50%	71
Figura 21. Correlação entre as percentagens de inibição dos 88 extratos brutos concentrados em 50% que apresentaram efeito significativo sobre a germinação dos conídios das variedades fisiológicas de <i>M. ulei</i> PMB26 e PMB28	72
Figura 22. Correlação entre as percentagens de inibição dos 34 extratos brutos sobre a germinação dos conídios das variedades fisiológicas de <i>M. ulei</i> PMB26 e PMB28 na concentração de 12,5%	75
Figura 23. Campos sob visualização em microscópio óptico na objetiva de 10X, selecionados para a contagem de conídios de <i>M. ulei</i> PMB26, os quais foram mantidos por 12 horas em B.O.D. a 24°C sobre placas de Petri contendo o ágar a 1,5%	77
Figura 24. Campos sob visualização em microscópio óptico na objetiva de 10X, selecionados para a contagem de conídios de <i>M. ulei</i> PMB28, os quais foram mantidos por 12 horas em B.O.D. a 24°C sobre placas de Petri contendo ágar a 1,5%	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descritivo agrônômico dos clones utilizados para amostragem dos fungos endofíticos conforme informações cedidas pela PMB	41
Tabela 2. Número de fungos filamentosos isolados e purificados de acordo com a variedade de <i>H. brasiliensis</i> estudada e o meio de cultura utilizado para o isolamento	59
Tabela 3. Fungos endofíticos selecionados para os ensaios de antagonismo contra o fitopatógeno <i>M. ulei</i> , distribuídos de acordo com a variedade de <i>H. brasiliensis</i> em que foram recuperados	64
Tabela 4. Resultados de análises de variância (ANOVA) para o teste da concentração do meio de cultura liofilizado sobre a germinação de dois isolados de <i>M. ulei</i> (PMB26 e PMB28)	67
Tabela 5. Determinação das médias de germinação dos conídios de <i>M. ulei</i> (PMB26 e PMB28) em diferentes concentrações do meio de cultura extrato de malte	67
Tabela 6. Distribuição do número de isolados de fungos endofíticos nos ensaios de antagonismo (extratos brutos de 50%) contra <i>M. ulei</i> , de acordo com o efeito sobre a germinação dos conídios e a linhagem de <i>H. brasiliensis</i>	72
Tabela 7. Médias percentuais de inibição dos fungos endofíticos que apresentaram influência significativa (teste de “t” de student, $p < 0,05$) sobre a germinação dos conídios das duas variedades fisiológicas de <i>M. ulei</i> (PMB26 e PMB28), na presença de extratos concentrados em 50%	73
Tabela 8. Distribuição do número de fungos endofíticos submetidos aos ensaios de antagonismo contra as duas variedades fisiológicas de <i>M. ulei</i> (PMB26 e PMB28) com extratos brutos 12,5%, conforme o efeito inibitório apresentado e a linhagem de <i>H. brasiliensis</i> em que foram recuperados	75
Tabela 9. Médias percentuais de inibição dos fungos endofíticos que apresentaram influência significativa (teste de “t” de student, $p < 0,05$) com inibição acima de 80% sobre a germinação dos conídios das duas variedades fisiológicas de <i>M. ulei</i> (PMB26 e PMB28), na presença de extratos concentrados em 12,5%	76
Tabela 10. Relação dos fungos endofíticos identificados, que apresentaram efeito inibitório acima de 80% sobre a germinação dos conídios de <i>M. ulei</i> PMB26 e PMB28 nas concentrações de extrato bruto 50% e 12,5%	81

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A. Lista dos indivíduos de <i>Hevea brasiliensis</i> utilizados no presente trabalho	105
Apêndice B. Dados de contagem de conídios e porcentagens de germinação dos campos visualizados ao microscópio óptico (objetiva 10X) nos testes de germinação de conídios da variedade fisiológica de <i>M. ulei</i> PMB 26	106
Apêndice C. Dados de contagem de conídios e porcentagens de germinação dos campos visualizados ao microscópio óptico (objetiva 10X) nos testes de germinação de conídios da variedade fisiológica de <i>M. ulei</i> PMB 28	124

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	FUNGOS ENDOFÍTICOS	17
2.1.1	Histórico e abrangência do termo	17
2.1.2	Penetração, colonização e transmissão de fungos endofíticos	18
2.1.3	Detecção e isolamento de fungos endofíticos	20
2.1.4	Diversidade taxonômica	23
2.1.5	Contribuições dos fungos endofíticos para o desenvolvimento das plantas	24
2.1.6	A importância dos produtos naturais e o papel dos fungos endofíticos como fonte de produtos bioativos.....	27
2.2	<i>MICROCYCLUS ULEI</i> (Henn.) Arx	31
2.2.1	Características morfológicas do <i>M. ulei</i>	32
2.2.2	Ciclo de vida do <i>M. ulei</i>	33
2.2.3	Principais formas de controle	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE COLETA.....	40
3.2	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	43
3.2.1	Desinfecção superficial	43
3.2.2	Método de isolamento	44
3.3	PURIFICAÇÃO, PRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DAS COLÔNIAS DE FUNGOS ISOLADOS DE <i>H. brasiliensis</i>	46
3.4	ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	47
3.4.1	Obtenção do extrato bruto	47
3.4.2	Produção dos conídios	50
3.4.3	Influência do meio de cultivo Extrato de Malte sobre a germinação dos conídios de <i>M. ulei</i> PMB26 e <i>M. ulei</i> PMB28	52
3.4.4	Teste de germinação dos conídios de <i>M. ulei</i> PMB26 e de <i>M. ulei</i> PMB28 produzidas em PB314 na presença do extrato bruto do meio de cultivo dos fungos isolados	53
3.5	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA <i>M. ULEI</i>	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	58
4.1.1	Desinfecção superficial	58
4.1.2	Isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos	58
4.2	ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	63
4.2.1	Obtenção do extrato bruto	63
4.2.2	Produção dos conídios	65
4.2.3	Influência do Extrato de Malte sobre a germinação dos conídios de <i>M. ulei</i> PMB26 e <i>M. ulei</i> PMB28	66
4.2.4	Teste de germinação dos conídios de <i>M. ulei</i> PMB26 e de <i>M. ulei</i> PMB28 produzidas em PB314 na presença do extrato bruto do meio de cultivo dos fungos endofíticos	69

4.3	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA O <i>Microcycclus ulei</i>	79
5	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICES	105

1 INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea* sp.), planta natural da Amazônia, constitui a maior fonte produtora de borracha vegetal do mundo. Dentre as suas onze espécies conhecidas, destaca-se a *Hevea brasiliensis* (Willd. ex-Adr. de Juss) Muell.- Arg), com maior variabilidade genética e capacidade produtiva. Possui uma grande importância sócio-econômica, tendo até mesmo caracterizado uma época denominada de “ciclo da borracha”.

O Brasil, que possui condições edafoclimáticas altamente favoráveis ao desenvolvimento da heveicultura e dispõe de milhões de hectares para plantio (MATOS, 2003), era, até o final da década de 50 do século XX, o maior fornecedor mundial de borracha. Entretanto, atualmente contribui com apenas 0,95% da produção global, e importa 66% de borracha natural para seu consumo interno, não conseguindo assim suprir as necessidades de sua demanda interna.

Uma das principais dificuldades à expansão da produção de borracha natural no país é a ocorrência doença sul-americana das folhas da seringueira (SALB – South American Leaf Blight), também conhecida como mal-das-folhas ou queima-das-folhas, causada pelo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, que pode provocar desfolhações sucessivas em indivíduos suscetíveis, reduzindo a produção de látex e acarretando na mortalidade da planta. Devido a esta doença, a heveicultura no Brasil, que era restrita às áreas úmidas da Amazônia, deslocou-se, paulatinamente, para outras regiões, com clima seco definido, possibilitando uma tentativa de “escape” à doença pela redução da umidade relativa.

A solução para ocupar novamente uma posição de relevância, ou mesmo minimizar os volumes de importação do produto na busca da auto-suficiência, encontra-se na expansão dos plantios racionais de seringueira, com produtividades elevadas. Para isso, diversas estratégias de controle da SALB têm sido estudadas, incluindo controle químico, controle biológico, indução de resistência, identificação de áreas livres da doença, uso de clones resistentes e melhoramento genético.

Os microrganismos endofíticos têm atraído muita atenção nos últimos anos, por serem reconhecidos como depósitos de novos produtos bioativos, alguns dos quais com atividade biologicamente benéfica para a planta. Dentre os microrganismos endofíticos, os fungos são os mais representativos, desempenhando um papel importante para a defesa da planta. A relação mutualística entre esses fungos e a planta

pode resultar em mudanças morfofisiológicas nesta última, trazendo diversas vantagens tais como a promoção de crescimento e o aumento da capacidade de resistência a doenças.

Tendo em vista a importância da descoberta de novas alternativas para o combate e controle da SALB, o presente trabalho teve como propósito selecionar fungos endofíticos antagonísticos ao fitopatógeno *M. ulei*, isolados de três variedades de *H. brasiliensis* com diferentes níveis de tolerância. Como, até o momento, não foi realizado nenhum trabalho de caracterização da comunidade endofítica da seringueira, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- (i) isolar, purificar e preservar os fungos endofíticos da lâmina foliar de variedades de *H. brasiliensis* (seringueira) suscetíveis e tolerantes ao ataque do *M. ulei*;
- (ii) realizar testes de antagonismos *in vitro* contra a germinação de esporos assexuados do *M. ulei*;
- (iii) identificar os fungos endofíticos antagonísticos ao *M. ulei*.

Este estudo compreendeu uma colaboração estreita entre pesquisadores da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS-BA), Plantações Michelin da Bahia (PMB) e Instituto Francês de Pesquisa Agrônômica (CIRAD - L'institut Français de Recherche Agronomique) em uma rede cooperativa de pesquisa para a realização deste trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

2.1.1 Histórico e abrangência do termo

A existência de microrganismos no interior de tecidos vegetais já é conhecida desde o início do século XIX, quando Unger (1832), citado por Petrini e Müller (1986), mencionou, pela primeira vez, o termo endofítico, abrangendo todos os fungos que habitavam o interior de plantas em situações de infecções sintomáticas ou não (PETRINI; MULLER, 1986; STONE, 1986). Inicialmente, todos os microrganismos presentes no interior de tecidos sadios eram considerados patógenos em estado de latência ou saprófitos oportunistas, normalmente epífitos, com eventual colonização endofítica, que não causavam danos aparentes à planta hospedeira (ABREU, 2005). De Bary (1866), citado por Azevedo (1998), foi quem primeiro propôs uma possível distinção entre os endofíticos e os patógenos de plantas. Desde então, vários trabalhos vêm apresentando definições nem sempre congruentes para o termo endofítico.

Embora fungos endofíticos tenham sido descritos há mais de um século, somente nas últimas décadas tais microrganismos receberam considerável atenção, quando foi reconhecida sua capacidade de proteger as plantas contra patógenos e insetos predadoras (JACOBS et al., 1985; MISAGHI e DONNDELINGER, 1990; HALLMANN et al., 1997; AZEVEDO, 2000). Estudos mais completos, envolvendo a taxonomia e a ecologia de fungos endofíticos, foram iniciados a partir do final da década de 70 do século passado, com os trabalhos conduzidos por Carroll e seus colaboradores (BERNSTEIN; CARROLL, 1977; CARROLL; CARROLL, 1978), nos quais dezenas de espécies de fungos foram isoladas do interior de acículas sadias de várias coníferas. CARROLL (1986) restringiu o uso do termo endófito a organismos que causam infecções assintomáticas nos tecidos internos de plantas, excluindo os fungos patogênicos e mutualísticos, tais como as micorrizas. Na mesma década, este autor apresentou outro trabalho (CARROLL, 1988), o qual, de modo mais abrangente, distinguia os fungos endofíticos dos epifíticos, destacando que os primeiros são encontrados mais comumente no interior das plantas. Petrini (1991) sugeriu a expansão

da definição criada por Carrol (1986; 1988), incluindo os fungos que, habitando a parte aérea dos órgãos das plantas, fossem capazes de colonizar, em pelo menos algum período de seu ciclo de vida, os tecidos internos da planta sem causar dano aparente ao seu hospedeiro. De acordo com este autor, a simples presença do fungo tipicamente patogênico no interior da planta não é um indicativo de que este causará prejuízos à sua hospedeira, pois o controle da relação de antagonismo dependerá de fatores ambientais, daqueles relacionados com a virulência do fungo e do grau de resistência da planta hospedeira. O autor também considera a existência de fungos endófitos que apresentam longo período epifítico. Wilson (1995) propôs a ampliação da abrangência do termo endofítico para as bactérias e leveduras, esclarecendo que o mesmo não deveria se restringir única e exclusivamente aos fungos filamentosos, como vinha acontecendo. Ainda são incluídos neste grupo, organismos protistas (PETERS, 1991) e insetos (FELLER, 1995; GRISSELL; SCHAUFF, 1997).

A distinção entre endófitos, epífitos (que vivem na superfície da planta) e fitopatógenos (que causam doenças às plantas) possui um significado puramente didático. Existe um gradiente que os separam, o que dificulta o estabelecimento de limites para discriminar cada categoria. As bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos são microrganismos que poderiam ser considerados endofíticos, uma vez que vivem numa íntima relação com seus hospedeiros. Entretanto, por apresentarem estruturas externas como os nódulos (bactérias fixadoras de nitrogênio) e as hifas (fungos micorrízicos), são distinguidos de outros microrganismos endofíticos de raiz (AZEVEDO et al., 2006).

De acordo com HAWKSWORTH (2004), o estudo dos fungos presentes nos diferentes ambientes do planeta ainda está longe do ideal. O mesmo autor, reexaminando diferentes trabalhos da biodiversidade dos fungos, estimou que existam 1,5 milhões de espécies de fungos. Esta riqueza de espécies é fonte de diversidade genética e, conseqüentemente, de novos e úteis produtos biotecnológicos (STROBEL, 2003).

2.1.2 Penetração, colonização e transmissão de fungos endofíticos

Em geral, os microrganismos endofíticos penetram nas plantas através de aberturas naturais ou ferimentos. A forma mais comum de penetração desses microrganismos

ocorre principalmente pelas raízes, pelo fato de apresentarem abrasões durante a emergência de raízes secundárias laterais. Partes aéreas das plantas também são portas de entrada para esses microrganismos, tais como flores, cotilédones e estômatos, além de aberturas causadas por insetos e até por estruturas de fungos patogênicos (MELO; AZEVEDO, 1998). Segundo Azevedo (1998), existe uma outra forma de penetração dos endófitos nos vegetais, sendo conhecida como ação ativa, na qual o microrganismo produz enzimas e/ou estruturas que facilitam a entrada no hospedeiro.

Após a penetração, os organismos endofíticos movimentam-se dentro da planta, colonizando os diversos órgãos e tecidos (AZEVEDO, 1998). Estes microrganismos podem estar presentes subcuticularmente ou dentro de tecidos vegetais nos espaços intercelulares (ou raramente nos espaços intracelulares), tanto em partes aéreas como folhas, frutos, caules, sementes e óvulos, quanto em raízes e tubérculos (MCINROY e KLOEPPER, 1995).

Alguns fungos endofíticos possuem preferência pela colonização de determinados órgãos ou parte destes, o que expressa certo grau de especificidade desses fungos a nichos restritos e bastantes característicos em seus hospedeiros (ABREU, 2005). Segundo Hata et al. (2002), essa diferenciação nos padrões de colonização ocorre devido a prováveis interações antagônicas entre as diferentes espécies de fungos presentes, as quais poderiam restringir os seus nichos de colonização.

A transmissão dos fungos endofíticos de uma geração para outra ocorre de modo vertical ou horizontal (CARROLL, 1988). A transmissão vertical se dá através de propágulos vegetativos ou via semente (Figura 1), como é o caso de Ascomicetos pertencentes à família Clavicipitaceae, que ocorrem em gramíneas de regiões temperadas (CLAY; SCHARDL, 2002). Tais fungos, denominados por Carroll (1988) como mutualistas obrigatórios (constitutivos), apesar de representarem uma baixa diversidade, estão fortemente associados a processos de defesa da planta (CLAY, 1988; SAIKKONEN et al., 1998; MALINOWISKI; BELESKY, 1999). A transmissão horizontal se dá através de esporos, sexuados ou assexuados, transportados pelo ar, água ou insetos (Figura 1). Endófitos associados com folhas de plantas lenhosas são transmitidos horizontalmente (BAYMAN et al., 1998; ARNOLD; HERRE, 2003). Estes microrganismos representam uma grande diversidade, e sua frequência no hospedeiro é fortemente influenciada por fatores climáticos. Por causa desta diversidade, a maioria dos estudos tem focado mais a composição de espécies de fungos e seus padrões de

distribuição do que as relações e funções exercidas pelos endófitos sobre seus hospedeiros (ARNOLD et al., 2003; ABREU, 2005).

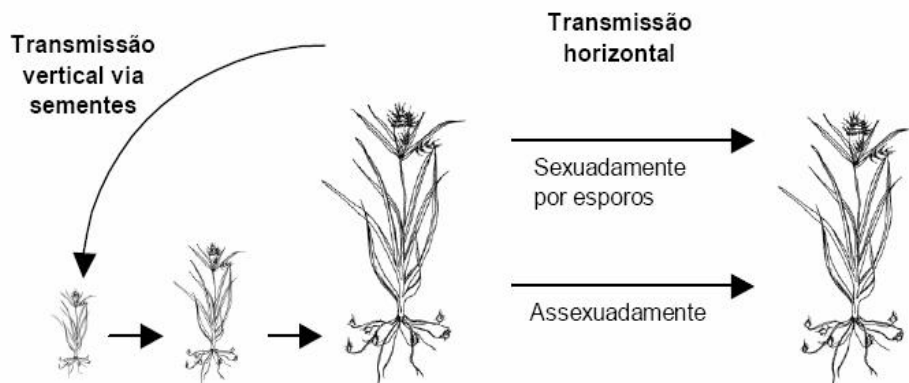


Figura 1. Ciclo de vida de fungos endofíticos em associação com o hospedeiro.

Fonte: GUIMARÃES, 2006.

2.1.3 Detecção e isolamento de fungos endofíticos

A observação indireta de culturas puras obtidas de colônias fúngicas crescidas em meio de cultivo a partir de tecido vegetal desinfestado superficialmente consiste na principal forma de detecção de fungos endofíticos (SIEGAL et al., 1987). A observação direta dos fungos endofíticos em tecidos senescentes de seus hospedeiros é dificultada pelo crescimento de saprófitos nestes tecidos, impedindo a distinção entre esses dois grupos. Entretanto, segundo SINCLAIR; CERKAUSKAS (1996), esse mecanismo pode ser facilitado com o uso do herbicida Paraquat[®], o qual induz a esporulação precoce dos fungos colonizadores do interior dos tecidos (ABREU, 2005).

Segundo Petrini et al. (1992), a composição de fungos associada a uma mesma espécie vegetal não se altera muito quando as amostragens são realizadas em locais de coleta distantes. Entretanto, a frequência relativa das espécies de fungos, mesmo entre plantas de mesma espécie, pode variar bastante de acordo com o regime de chuvas de cada local (CARROL, 1978), o isolamento do hospedeiro em relação a outras plantas e a idade dos órgãos vegetais utilizados (BERNSTEIN; CARROL, 1977; ARNOLD et al., 2003), o que, de acordo com Abreu (2005), dificulta o isolamento de espécies raras.

Após coletado, o material vegetal deve ser processado o mais rápido possível, no intuito de evitar alterações na taxa de recuperação dos endófitos causadas por fatores relacionados ao período de estocagem do material (ABREU, 2003). Quando o processamento imediato não é possível, o armazenamento do material coletado deve ser feito, evitando tanto o excesso de umidade, que leva à rápida proliferação de saprófitos, quanto à rápida secagem das amostras devido à exposição direta ao sol (BILLS, 1996; ABREU, 2005). Johnson (1998), após isolar fungos endofíticos a partir de folhas estocadas de *Leptospermum scoparium*, verificou que a composição de espécies dos endófitos recuperados não foi afetada, porém a recuperação do fungo *Phyllosticta* sp., comumente isolado nesta planta, foi bastante reduzida. Paulus *et al.* (2003) verificaram que o aumento do tempo de estocagem de folhas coletadas de *Neolitsea dealbata* diminuiu a frequência de isolamento das espécies de fungos mais comuns.

No processamento das amostras vegetais coletadas para o isolamento, deve ser realizada primeiramente uma desinfecção superficial do material vegetal, no intuito de eliminar microrganismos epifíticos e saprófitos comumente presentes na superfície dos tecidos vegetais. Este procedimento geralmente consiste na lavagem inicial com água destilada, seguida por um tratamento químico com álcool e com hipoclorito de sódio. As concentrações e os tempos de exposição dos tecidos aos compostos químicos utilizados variam muito de acordo com o tipo de tecido coletado (BILLS; POLISHOOK, 1992). Outros mecanismos, como o uso de peróxido de hidrogênio (HATA *et al.*, 2002), o uso do detergente Tween diluído (BAYMAN *et al.*, 1998), ou a lavagem seriada dos tecidos em água destilada sob agitação (PETRINI *et al.*, 1990), também são empregados para a desinfecção superficial, porém com menor frequência.

Normalmente o material vegetal desinfestado superficialmente é fragmentado seguindo um padrão definido, sendo posteriormente transferido para placas de Petri contendo meio de cultura adequado (PHOTITA *et al.*, 2001; HATA *et al.*, 2002). Considerando que alguns fungos endofíticos apresentam distribuição restrita no interior de seus hospedeiros, quanto maior a superfície de contato do tecido vegetal com o meio de cultura, maior é a chance de recuperação de um grande número de isolados por unidade de área amostrada. Para isso, a trituração do material vegetal ou diminuição do tamanho dos fragmentos do material vegetal constituem métodos importantes (GAMBOA *et al.*, 2002).

Com relação ao meio de cultura para o isolamento de fungos endofíticos, meios contendo o extrato de malte, como fonte nutricional, são os mais comumente utilizados,

podendo ser enriquecidos com extrato de levedura. Trata-se de um meio não-seletivo, e a sua adoção generalizada em diversos trabalhos é um bom indício de sua eficiência para recuperação de uma grande variedade de espécies de fungos. O uso de uma fonte nutricional restrita pode, evidentemente, levar a uma seleção ou, pelo menos, ao favorecimento de algumas espécies de fungos, as quais acabam sendo isoladas com maior frequência do que outras (BILLS; POLISHOOK, 1991, 1994b; PETRINI et al., 1992). Exemplos de outros meios de cultura já usados com sucesso no isolamento de fungos endófitos são: BDA (Batata dextrose Agar), meio não seletivo; e OA (Aveia e Agar), meio seletivo normalmente enriquecido com traços de sais, usado para o isolamento de actinobactérias (BERNSTEIN; CARROLL, 1977; FRÖHLICH et al., 2000; RODRIGUES, 1994). No presente trabalho, além da utilização dos meios não-seletivos acima citados, utilizou-se este último mencionado, acrescido com traços de sais, levando-se em conta que os microrganismos isolados a partir deste meio são freqüentemente citados na literatura como produtores de substâncias bioativas, conforme mencionado por Abreu (2005).

Substâncias químicas são normalmente adicionadas aos meios de cultura para o isolamento de fungos endofíticos. Essas substâncias são antibióticos e compostos fungistáticos ou fungicidas em baixas concentrações e visam suprimir o crescimento bacteriano e impedir que algumas espécies de fungos desenvolvam-se muito rapidamente, inibindo o desenvolvimento daquelas espécies de crescimento mais lento. As substâncias estreptomicina, clorotetraciclina, oxitetraciclina e o cloranfenicol destacam-se dentre os antibióticos comumente empregados para este fim (BILLS; POLISHOOK, 1991, 1992; FISHER et al., 1986; FRÖHLICH et al., 2000; PETRINI; FISHER, 1986; PHOTITA et al., 2001). Com relação aos fungicidas que podem ser empregados em baixas concentrações, podem ser utilizados o benomil e a cicloheximida, compostos bastante eficientes no controle do crescimento das colônias de fungos associados a tecidos rígidos (BILLS; POLISHOOK, 1991). O corante rosa de bengala constitui um agente fungistático bastante empregado como controlador de crescimento no isolamento de fungos endófitos (PHOTITA et al., 2001). A substância ciclosporina A, também constitui um composto muito eficiente no controle do crescimento fúngico, sendo capaz de provocar distorções nas hifas sem levá-las a morte (BILLS, 1996).

2.1.4 Diversidade taxonômica

As espécies fúngicas recuperadas de tecidos vegetais sadios podem ser pertencentes aos filos Glomeromycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e fungos mitospóricos (HUANG et al., 2001; SURYANARAYANAN et al., 2005; GUANATILAKA, 2006). Entretanto, os fungos mais comumente isolados são representados pelo filo Ascomycota, geralmente em sua fase anamórfica (SCHULZ et al., 1999; ABREU, 2005). A recuperação de outros grupos de fungos ocorre esporadicamente, podendo este fato ocorrer devido à restrita metodologia padrão de isolamento aplicada na maioria dos trabalhos, com o uso de produtos químicos e meios de cultivo a base de malte (PETRINI et al., 1992).

A ocorrência de diferentes grupos de fungos de endofíticos varia de acordo com o habitat do hospedeiro. No entanto, alguns gêneros tais como *Fusarium*, *Phomopsis* e *Phoma* são comuns tanto em plantas tropicais quanto temperadas. Em ecossistemas tropicais, os grupos de fungos endofíticos mais comumente encontrados são *Glomerella* (anamorfo *Colletotrichum*), *Guignardia* (anamorfo *Phyllosticta*), *Corynespora*, *Pestalotiopsis*, *Cladosporium*, *Lasiplodia*, *Sporormiella* e *Xylaria* (RODRIGUES; SAMUELS, 1999; FROHLICH et al., 2000; SURYANARAYANAN et al., 2005; SCHULZ; BOYLE, 2005). Alguns fungos, não comumente isolados, apresentam, em algumas situações, maior frequência de isolamento. É o caso de *Letendreaopsis palmarum*, fungo isolado de *Euterpe oleracea* (RODRIGUES, 1994) e *Rhabdocline parkeri*, recuperado da planta *Pseudotsuga menziesii* (SHERWOOD-PIKE et al., 1986).

É comumente registrado na literatura a presença de fungos no interior de plantas sadias que são normalmente isolados como fitopatógenos. Um exemplo é o fungo *Colletotrichum gloesporioides*, espécie patogênica causadora de uma doença chamada antracnose, que acomete órgãos externos de diversas espécies vegetais (GAMBOA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2004). Este fungo é frequentemente recuperado como endofítico de cafeeiro (PHOTITA et al., 2001), bananeira selvagem (OKANE et al., 1998), cajueiro, mangueira, umbuzeiro, mamona e mandioca (FREIRE; BEZERRA, 2001).

Muitos estudos têm evidenciado a presença de um grande número de isolados endofíticos que apresenta nenhuma ou reduzida capacidade de produzir estruturas reprodutivas em culturas axênicas, o que dificulta a sua identificação. É o caso de

ascomicetos tipicamente endofíticos pertencentes à família Xylariaceae, que são geralmente denominados como *Xylaria* spp. ou fungos xilariáceos (PETRINI et al., 1992; PETRINI et al., 1995). A produção de estruturas reprodutivas desses fungos em cultura pura geralmente é bastante demorada, podendo levar meses (BAYMAN et al., 1998). A ocorrência de micélios estéreis pode estar relacionada à ausência de fatores nutricionais e condições ambientais favoráveis à esporulação dos fungos em meio de cultura. Várias estratégias têm sido empregadas no intuito de identificar taxonomicamente espécies fúngicas que apresentam estas características. A transferência de pedaços de micélios estéreis para fragmentos autoclavados da planta hospedeira e a adição de tiras de celulose em meios de cultura podem induzir a produção de estruturas reprodutivas (BILLS; POLISHOOK, 1994b; GUO et al., 2000). Outra metodologia utilizada para a identificação desses fungos é a extração do DNA dos micélios estéreis e posterior amplificação e seqüenciamento de regiões de espaçadores ou de genes codificadores do RNA ribossômico, seguido da comparação dos resultados em base de dados especializados. Entretanto, este método nem sempre permite a identificação ao nível de espécie, limitando-se ao gênero ou família (GUO et al., 2000, 2001).

O sistema de nomenclatura baseado em morfo-grupos tem se mostrado insatisfatório para a definição e correta distinção entre espécies. O agrupamento de isolados fúngicos de acordo com características culturais macroscópicas, quando utilizado para fungos que produzem micélios estéreis, pode levar a valores subestimados da diversidade de fungos recuperados (BILLS; POLISHOOK, 1994a). Em outros casos, quando este método é ampliado para todos os fungos endofíticos recuperados de um hospedeiro, o grande polimorfismo apresentado por muitos isolados de uma mesma espécie fúngica pode levar a uma falsa hiperdiversidade devido a uma grande redundância taxonômica dentre os endófitos mais freqüentemente isolados (CANNON; SIMMONS, 2002; SURYABARAYANAN et al., 2002; SURYABARAYANAN et al., 2003).

2.1.5 Contribuições dos fungos endofíticos para o desenvolvimento das plantas

A colonização assintomática dos fungos endofíticos resulta de uma relação antagônica balanceada, que depende não só da adaptação do endofítico a um hospedeiro

ou órgão em particular, e dos estágios de desenvolvimento dos parceiros, mas também da virulência inata variável do endófito, da resposta de defesa do hospedeiro e das condições ambientais (SCHULZ; BOYLE, 2005). No entanto, este delicado equilíbrio não exclui a possibilidade do endófito trazer benefícios ao hospedeiro ou vice-versa. Nos últimos anos, a descoberta de novas perspectivas sobre a interação de microrganismos com seus hospedeiros revelou a existência de diversos efeitos positivos para o desenvolvimento das plantas, atribuídas aos fungos endofíticos, tais como a promoção do crescimento vegetal, o aumento da resistência a condições de estresses abióticos, a utilização de endófitos como vetores de genes de resistência e o controle biológico de pragas e doenças (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; STAMFORD et al., 2001; STAMFORD et al., 2002; SUTO et al., 2002; STROBEL, 2003).

A promoção do crescimento vegetal por fungos endofíticos se dá principalmente pela produção de fitohormônios que provocam efeitos fisiológicos na planta, tais como o aumento da capacidade de absorção de minerais como nitrogênio e fósforo (GASONI; GURFINKEL 1997; FRANKEN et al. 1998). White Junior et al. (1993), acreditam que fungos produtores de hormônios de crescimento o fazem visando à extração de nutrientes para o seu próprio metabolismo. Dos relatos existentes, pode ser citada a utilização do basidiomiceto *Piriformospora indica*, que é indicado para aplicação na floricultura, horticultura e agroflorestal, visando aumentar a produção comercial. Estudos da interação desse fungo com milho e fumo mostraram que a hifa coloniza o córtex da raiz promovendo uma maior absorção de nutrientes, e conseqüentemente, aumento da biomassa vegetal (VARMA et al., 1999).

O aumento da resistência da planta hospedeira às condições de estresses abióticos, relacionado com a presença de fungos endofíticos, ocorre devido ao fortalecimento do vigor da planta, promovido por alterações fisiológicas e estruturais da mesma. É o caso do fungo *Neothypodium*, endófito de *Festuca aerundinacea* que beneficia seu hospedeiro aumentando sua tolerância à seca (MAKI, 2006).

O controle biológico de pragas e doenças baseia-se na utilização de microrganismos que ajam como antagonistas a ação de predadores e agentes causadores das doenças (AZEVEDO, 2000). Isto pode ser feito devido à atuação direta do endófito por produção de substâncias nocivas aos predadores e patógenos, ou indiretamente por indução de resistência sistêmica (BENHAMOU; BRODEUR, 2000; MARCON, 2002).

Os fungos foram os primeiros microrganismos explorados para o controle biológico (VARMA et al., 1999; AZEVEDO et al., 2000), porém, muitas bactérias também vêm sendo estudadas para esta finalidade (RAJKUMAR et al., 2005; BERGSMAN-VLAMI et al., 2005; BIONDI, 2004).

O fungo endofítico *Beauveria bassiana*, após ter sido inoculado em plantações de milho, promoveu a proteção da planta contra o ataque de insetos (BING et al., 1993). Alguns isolados do gênero *Fusarium*, encontrados em raízes de diferentes cultivares de banana como fungos endofíticos naturais, têm demonstrado grande potencial como agentes de controle biológico para o manejo de nematóides parasitas de plantas (SPEIJER; SIKORA, 1993; AMIN, 1994; SCHUSTER et al., 1995; NIERE, 2001). Metabólitos tóxicos produzidos por estes isolados vêm sendo relatados como prováveis inibidores do desenvolvimento desses parasitas na planta (HALLMANN; SIKORA, 1996; POCASANGRE, 2000).

Lu et al. (2000) testaram a atividade antifúngica de 39 linhagens endofíticas isoladas da planta *Artemisia annua* L. (Asteraceae) contra os fitopatógenos de trigo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium graminearum*, *Gerlachia nivalis* e *Phytophthora capsici*. Destes isolados testados, 21 produziram compostos antagônicos a todos os microrganismos testados, mostrando o potencial de produtos produzidos por estes endófitos para o controle do desenvolvimento de fitopatógenos. Em estudo conduzido por Stinson et al. (2003), verificou-se que o fungo *Gliocladium* sp. endofítico isolado da planta *Eucryphia cordifolia*, na Patagônia, produz compostos orgânicos voláteis, capazes de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Pythium ultimum* e *Verticilum dahliae*.

Alguns endofíticos podem não atuar diretamente sobre seu antagonico, mas induzindo uma resposta na planta, ativando seu sistema de defesa. Essa indução de resistência está associada a alterações bioquímicas e estruturais na planta hospedeira, as quais atuam limitando o desenvolvimento de predadores e fitopatógenos na planta (DUIJFF et al., 1997; M'PIGA et al., 1997). Estudos de análise citológica em um isolado não patogênico de *Fusarium oxysporum*, conduzidos por Benhamou e Garand (2001), demonstraram que este endófito induziu uma série de mecanismos de defesa em células de tecidos da raiz de ervilha. Estas células sofreram várias alterações, como a deposição de material opaco na parede celular e no xilema, dificultando a entrada de patógenos nos tecidos do hospedeiro.

O controle biológico em espécies cultivadas vem ao encontro da necessidade de reduzir o consumo de agroquímicos nas culturas (ARAÚJO et al., 2002). O uso de pesticidas através de aplicações periódicas devido à interferência de fatores ambientais como a chuva, aumenta o custo de produção, além de trazer prejuízos à saúde por intoxicação e problemas ambientais como contaminações de fontes de água e destruição da microflora do solo. Uma vez que os endofíticos se multiplicam dentro da planta, estando protegidos do ambiente externo, a aplicação destes organismos pode ser realizada em quantidades mínimas por área, o que reduz substancialmente os custos e os prejuízos ambientais (CERIGIOLI, 2005).

Embora os mecanismos envolvidos no controle biológico por fungos endofíticos não sejam totalmente conhecidos, este processo vem adquirindo uma importância crescente. Por isso, faz-se necessário a realização de mais estudos sobre aspectos biológicos, genéticos e fisiológicos da interação endófito-planta-patógeno, possibilitando uma melhor aplicação prática desses microrganismos.

Vários endófitos produtores de compostos que contribuem para a defesa de seu hospedeiro vêm sendo também utilizados como fonte de produtos bioativos de interesse farmacológico e biotecnológico (ARNOLD et al., 2003; SCHULZ; BOYLE, 2005).

2.1.6 A importância dos produtos naturais e o papel dos fungos endofíticos como fonte de produtos bioativos

A pesquisa de produtos naturais constitui uma estratégia fundamental para descoberta de novos compostos de interesse na indústria farmacêutica e agroquímica. Na última década, a química combinatória, ferramenta utilizada como geradora de diversidade química; e os ensaios em larga escala (HTS - "high-throughput screening"), baseado em alvos moleculares, revolucionaram os processos de obtenção de novas drogas na indústria (NEWMAN et al., 2003; TEIXEIRA, 2007). Entretanto, o impacto esperado destas novas tecnologias na produtividade não tem sido materializado, devido ao fraco poder de penetração da maioria das drogas obtidas por estas tecnologias. Apesar de muitos produtos naturais possuírem uma complexidade estrutural que dificulta mudanças na sua estrutura química e, conseqüente otimização dos mesmos, eles permanecem como a ferramenta de maior sucesso para a descoberta de novos produtos bioativos (HARVEY, 2000). Os produtos naturais possuem várias vantagens

que justificam sua importância, tais como a sua grande diversidade química que, aliada a novas técnicas de otimização, eles permanecem altamente relevante para a produção de compostos importantes (VERDINE, 1996), além da descoberta de novas rotas biossintéticas servindo como guia para a biologia molecular e química (BREINBAUER et al., 2002) e a existência de diversas fontes de compostos de origem natural ainda pouco explorados (HENKEL et al., 1999). Como exemplo da importância dos produtos naturais, podemos citar a ampla variedade de imunossupressores presentes no mercado farmacêutico, a existência de diversos anti-hipertensivos de origem natural atuando como inibidores da angiotensina e a grande variedade de agentes antitumorais desenvolvidos a partir de produtos de origem natural (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Atualmente, vários trabalhos realizados na área de produtos naturais têm sido conduzidos visando o estudo de fontes ainda pouco exploradas, como microrganismos extremofílicos, marinhos e endofíticos (NEWMAN, 2005). Muitas moléculas presentes na natureza são metabólitos secundários, substâncias de baixo peso molecular, produzidas pelos organismos em adaptação a funções específicas da natureza. Isso inclui os metabólitos microbianos, que agem como produtos bioativos de grande interesse na medicina, agricultura e indústria (STROBEL, 2002). Segundo SCHULZ et al. (2002), devido ao fato de os fungos endofíticos ocuparem nichos biológicos únicos, estando em constante interação metabólica com o hospedeiro, estes organismos são tidos como excelentes fontes de produtos naturais bioativos (Figura 2).

A possibilidade dos fungos endofíticos crescerem em diversos ecossistemas potencializa a sua capacidade de sintetizar uma grande variedade de produtos de interesse, uma vez que uma mesma linhagem desses microrganismos, quando crescida em diferentes condições pode produzir diferentes compostos (TEIXEIRA, 2007). Este fato evidencia a necessidade de mais estudos sobre a relação ecológica destes fungos com a planta hospedeira para se obter maior entendimento de como melhor explorar o potencial metabólico desses microrganismos (DEAN et al., 2005).

Os metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos abrangem diversos grupos químicos, como fenóis, esteróides, flavonóides, quinonas, terpenóides, xantonas, peptídeos, citocalasinas, alcalóides, compostos alifáticos e fenilpropanóides (SHULZ; BOYLE, 2005). Exemplos de metabólitos secundários bioativos de fungos incluem as glubosumonas, obtidos do endófito *Chaetomium globosum*, que são ativas contra células tumorais (BASHYAL et al., 2005), os compostos ácido citônicos A e B, isolados de *Cytospora* sp., e botralina, isolada de *Microsphaeropsis olivacea*, que

apresentaram atividade inibitória contra a protease acetil colinesterase (AChE) (HORMAZABAL et al., 2005). Compostos com atividade imunossupressora e antioxidante podem ser exemplificados com o metabólito secundário obtidos do endófito *Cephalosporium* sp. associado a *Trachelospermum jasminoides*. Em 2001, Rodrigues-Heerkltz et al. descreveram a estrutura química de um metabólito secundário, o ácido guignárdico, produzido pelo fungo *Guignardia* sp., o qual desenvolveu ação bactericida contra várias bactérias patogênicas. Pestacina (1,3 – dihidro – isobenzofurano), isolado a partir do fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora*, foi caracterizado por Harper et al. (2003) com potencial atividade antifúngica.

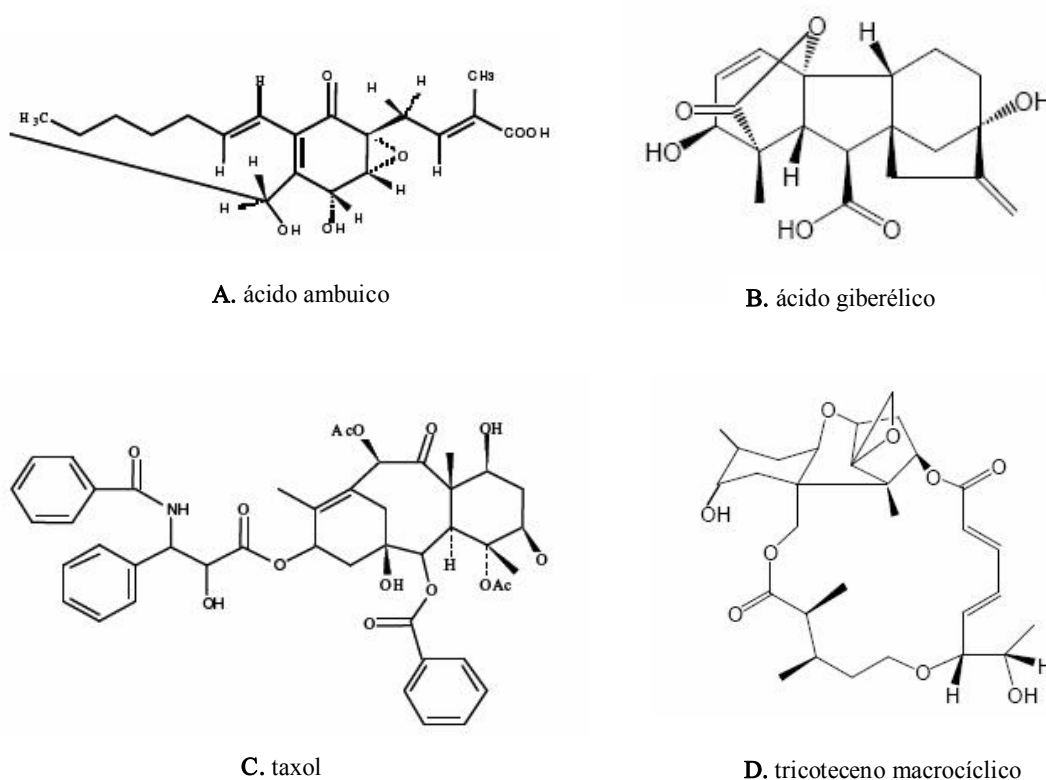


Figura 2. Metabólitos secundários de fungos endofíticos.

Diversos estudos têm relatado que alguns fungos endofíticos detêm a capacidade de produzir *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira (STROBEL, 2002). Estes relatos vêm a fortalecer a teoria sobre a transferência

horizontal de genes entre plantas e microrganismos endofíticos. Um exemplo pioneiro e bem marcante deste fato é a descoberta do composto diterpenóide taxol, também chamado de paclitaxel, um potente agente antitumoral, isolado inicialmente de extratos da planta *Taxus brevifolia* (WANI et al., 1971). Em 1993, este mesmo metabólito foi produzido a partir do endófito *Taxomyces andreanae*, isolado da mesma planta (STIERLE et al., 1993). Atualmente, vários fungos endofíticos recuperadas de diferentes espécies de plantas pertencentes ao gênero *Taxus* detêm a capacidade de produzir este composto e seus derivados (STROBEL et al., 2002). Outros exemplos de co-produção de produtos bioativos entre plantas e endófitos são os tricotecenos macrocíclicos, compostos produzidos pelos fungos *Fusarium* e *Myrothecium* isolados da planta *Baccharis megapotamica* (JARVIS et al., 1988); e o produto bioativo vincristina, substância antitumoral isolada do fungo *Mycelia sterilia* associado à planta *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004).

Alguns relatos na literatura evidenciam a ocorrência de diferenças significativas de atividade antimicrobiana entre fungos de uma mesma espécie. Guimarães (2006), após trabalho de atividade antimicrobiano com extratos líquidos produzidos por fungos associados à *Viguiera arenaria* (Asteraceae), verificou que várias cepas de uma mesma espécie fúngica, sob iguais condições de cultivo, apresentaram significativas diferenças quanto a sua atividade sobre fungos patogênicos. Esta constatação sugere que entre endofíticos da mesma espécie, isolados de uma mesma planta, pode haver variações genéticas que levam à produção de diferentes metabólitos, ou de quantidades diferentes destes compostos, nas mesmas condições de cultivo. Estas variações podem estar relacionadas à especificidade do metabolismo secundário do fungo a sua planta hospedeira (CISAR, 1999).

2.2 *MICROCYCLUS ULEI*(Henn.) Arx

O *Microcyclus ulei* é um fungo ascomiceto causador da doença sul-americana das folhas da seringueira (SALB – South American Leaf Blight), também denominada mal-das-folhas ou queima-das-folhas. Esta doença é uma das enfermidades mais importantes para a produção de borracha natural na América Latina, constituindo um dos maiores entraves para a expansão da heveicultura no Brasil. A SALB tem sido comparada a doenças de grande impacto à economia em outras culturas, tais como a ferrugem-do-cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), a mela-da-batatinha (*Phytophthora infestans*) e a vassoura-de-bruxa do cacau (*Moniliophthora perniciosa*) (CHEE; HOLLIDAY, 1986; GASPAROTTO et al., 1997; RUBINI, 2003; MAKI, 2006). No Brasil, esta doença ocorre em todas as regiões com condições edafoclimáticas propícias para o desenvolvimento de seringueira, o que causa inúmeras perdas econômicas (ROMERO, 2006), principalmente na região Amazônica (CHEE, 1986; GASPAROTTO et al., 1990).

O fungo *M. ulei* é um patógeno restrito a plantas do gênero *Hevea*, ocorrendo nas espécies *Hevea brasiliensis*, *H. guinensis*, *H. benthamiana*, *H. spruceana*, *H. camargaona*, *H. camporum* e seus híbridos (ROMERO et al., 2006). Este fungo se destaca pela sua grande capacidade de causar danos severos ao hospedeiro, provocando a queda prematura das folhas jovens (GASPAROTTO et al., 1997) ou mesmo o desfolhamento total da planta (ROMERO et al., 2006). As condições climáticas influenciam significativamente o desenvolvimento do fungo no hospedeiro, sendo temperaturas de 20°C a 24°C e umidade relativa do ar elevada (acima de 90%) fatores determinantes para a infecção do fitopatógeno na planta (HOLLIDAY, 1969; CHEE, 1976; ROCHA; VASCONCELOS FILHO, 1978; GASPAROTTO, 1989a, 1989b, 1997; GASPAROTTO; JUNQUEIRA, 1994). Em viveiros e em jardins clonais, a elevada incidência da doença diminui o crescimento das plantas, reduzindo a porcentagem de espécimes vegetais propícios para enxertia, devido à queda das folhas jovens do último lançamento foliar (GASPAROTTO et al., 1997). Em seringais adultos, ataques sucessivos do fungo causam o debilitamento do hospedeiro reduzindo a produção de látex ou facilitando a incidência de outras doenças, podendo determinar a morte-descendente, devido ao secamento dos terminais de hastes e galhos (GASPAROTTO et al., 1984, 1997; ROMERO, 2006).

Conforme Hennings (1904), citado por Holliday (1970), o fungo causador da SALB foi primeiramente isolado por Ulei em 1900 na região amazônica, Brasil. Este fungo ocorre em todas as regiões da América tropical onde as espécies de *Hevea* são nativas (HOLLIDAY, 1970; GASPAROTTO, 1997). Sua forma perfeita (fase telomórfica) constitui uma das 35 espécies conhecidas do gênero *Microcyclus* Sacc., Syd.; P. Syd., família Mycosphaerellaceae, pertencente ao filo Ascomycota. A fase anamórfica ou conidial deste fungo tem sido atualmente classificada dentro do gênero *Fusicladium*, sendo denominado como *F. heveae* (SHUBERT et al., 2003). Dentre as espécies do gênero *Microcyclus*, 15 apresentam-se como patógenos de folhas de plantas (ROMERO et al., 2006), algumas das quais restritas a um hospedeiro particular (CANNON et al., 1995).

2.2.1 Características morfológicas do *M. ulei*

O *M. ulei* apresenta três formas de esporos que caracterizam fases distintas do seu ciclo de vida (ROMERO, 2006):

1. Conídios (esporos assexuados) – representam a fase anamórfica ou conidial do fungo e sua presença na planta hospedeira caracteriza os primeiros sintomas da doença, geralmente aparentes cinco dias após a infecção. São estruturas elipsóides, de até 140 µm de comprimento e 4-7 µm de largura, hialinas quando jovens, tornando-se escuras com o tempo. Na planta hospedeira, normalmente formam massas pulverulentas de coloração verde oliva, de até 2 cm de diâmetro na superfície abaxial da folha, podendo causar distorções e lesões na lâmina foliar (HOLLIDAY, 1970). Podem também ocorrer em outros órgãos da planta como em flores e frutos jovens (ROMERO et al., 2006). O fungo normalmente produz quantidades grandes de conídios os quais são disseminados através da água da chuva ou vento (GASPAROTTO et al., 1997). A maioria dos experimentos *in vitro* com *M. ulei* tem sido realizada por meio de ensaios de germinação de conídios em placa. Isto se ocorre possivelmente devido à facilidade da obtenção desses esporos a partir de plantas susceptíveis.

2. Piconsporos – são esporos assexuados, esféricos, de 120-160 μm de diâmetro, com coloração marrom escura e produzidos ao redor de extremidades de lesões conidiais antigas, principalmente sobre a superfície adaxial de folhas com cerca de um mês de idade (HOLLIDAY, 1970). Estes esporos caracterizam a fase anamórfico-picnidial, armazenados em cavidades (picnídios) de coloração negra, exoepidermais, as quais se encontram agregadas especialmente na face superior dos folíolos (GASPAROTTO et al., 1997). O fungo, durante esta fase, é conhecido como *Micospharella heveae* (CHEE, 1975, citado por GASPAROTTO et al., 1984).
3. Ascósporos – são esporos sexuados depositados em ascostromas ou pseudotécios, os quais se encontram agregados em massas estromáticas globosas (estromas) de coloração negra, geralmente amontoados sobre a superfície superior dos folíolos adultos, formando, em algumas vezes, anéis bem delimitados, dando o aspecto de lixa. Estas estruturas caracterizam a fase teliomórfica ou sexuada do fungo, tomando o lugar dos picnídios. Os esporos sexuados são externamente similares aos picnídios, possuindo diâmetros de 200-400 μm (HOLLIDAY, 1970).

2.2.2 Ciclo de vida do *M. ulei*

O ciclo de vida do *M. ulei* (Figura 3) possui uma duração total de cerca de quatro a cinco meses e inicia-se na fase sexuada, sendo o ascósporo o inóculo primário de infecção. As seringueiras, a partir de quatro a cinco anos de idade, apresentam o fenômeno anual de caducifolismo (GASPAROTTO et al., 1997). As folhas maduras ou velhas com estromas negros agregados, após caírem, ou mesmo aqueles retidos em planta com caducifolismo atrasado, são molhadas por água de chuva ou orvalho (MATHER, 1954 citado por HOLLIDAY, 1970), o que provoca o aumento da tensão interna dos ascostromas ou pseudotécios, resultando na ejeção de ascósporos no meio externo, que são disseminados pelo vento até atingirem folíolos jovens (GASPAROTTO et al., 1997). Nestes folíolos, os ascósporos absorvem a umidade da chuva ou orvalho, germinam e produzem tubos germinativos que formam apressórios, a partir dos quais primórdios de hifas infectivas se desenvolvem, penetrando e

colonizando os folíolos. Este processo independe da pré-existência de aberturas naturais ou ferimentos (GASPAROTTO et al., 1989a, 1997).

Segundo Langford (1945), citado por Holliday (1970), os ascósporos encontram condições propícias para infectar o hospedeiro apenas quando expostos por um período de pelo menos dez horas consecutivas com umidade relativa acima de 95%, e temperatura média diária elevada, com um ótimo entre 24 e 26° C.

Em condições climáticas propícias ao desenvolvimento do fungo, cerca de cinco a seis dias depois da infecção primária, os folíolos infectados exibem lesões cobertas de esporulação conidial caracterizando a primeira fase assexuada (fase conidial) (GASPAROTTO et al., 1997) (Figura 4A). O aumento dessas lesões é observado entre o quinto e o sexto dia após a infecção (ROMERO et al., 2006), sendo normalmente mais abundantes na face abaxial do folíolo. O nível de esporulação varia da linhagem de seringueira infectada e das condições microclimáticas existentes (LANGFORD, 1953). A partir dos folíolos infectados, os conídios são disseminados pelo vento ou chuva, infectando outros folíolos novos da mesma planta ou de plantas diferentes (infecção secundária), da mesma maneira que os ascósporos (HOLLIDAY, 1970).

Os folíolos infectados, de forma primária ou secundária, em até 12 dias após a infecção, são suscetíveis à queda prematura pela doença, ocasionada após o aparecimento de numerosas lesões no limbo foliar (GASPAROTTO et al., 1989a). A fase conidial é o estágio mais agressivo da doença (fase explosiva), caracterizando-se pela ocorrência de infecções conidiais recicladas e novos desfolhamentos, o que traz como consequência a debilitação fisiológica da planta com o aumento do déficit energético devido à contínua reposição da área foliar (GASPAROTTO et al., 1997).

A partir de 12 dias da infecção até a maturação completa, os folíolos infectados não são mais suscetíveis à queda prematura, permanecendo assim na planta. Alguns folíolos com idade suscetíveis à queda permanecem firmes a planta, exibindo poucas lesões, geralmente de tamanho diminuto. Os folíolos presos à planta, após o período de 30 a 60 dias da infecção, exibem estruturas de coloração negra (sintoma de lixa) onde ficam acondicionados os picnídios, iniciando-se assim a fase anamórfico-picnidial. Nesta fase, até o momento, não foi encontrada nenhuma influência dos picnosporos na disseminação do patógeno, caracterizando-se apenas como um estágio intermediário entre a fase conidial e a fase sexuada (GASPAROTTO et al., 1997; ROMERO et al., 2006). Segundo Holliday (1970), os esporos picnidiais de *M. ulei* germinam, mas não provocam sintomas da doença.

Os folíolos infectados remanescentes, após dois a três meses em condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo, exibem estruturas estromáticas bem desenvolvidas dotadas de ascos e ascósporos (Figura 4B). Estes folíolos caem, durante ou logo após a época de caducifolismo, reiniciando o ciclo e então dando continuidade à vida do patógeno (GASPAROTTO et al., 1997).

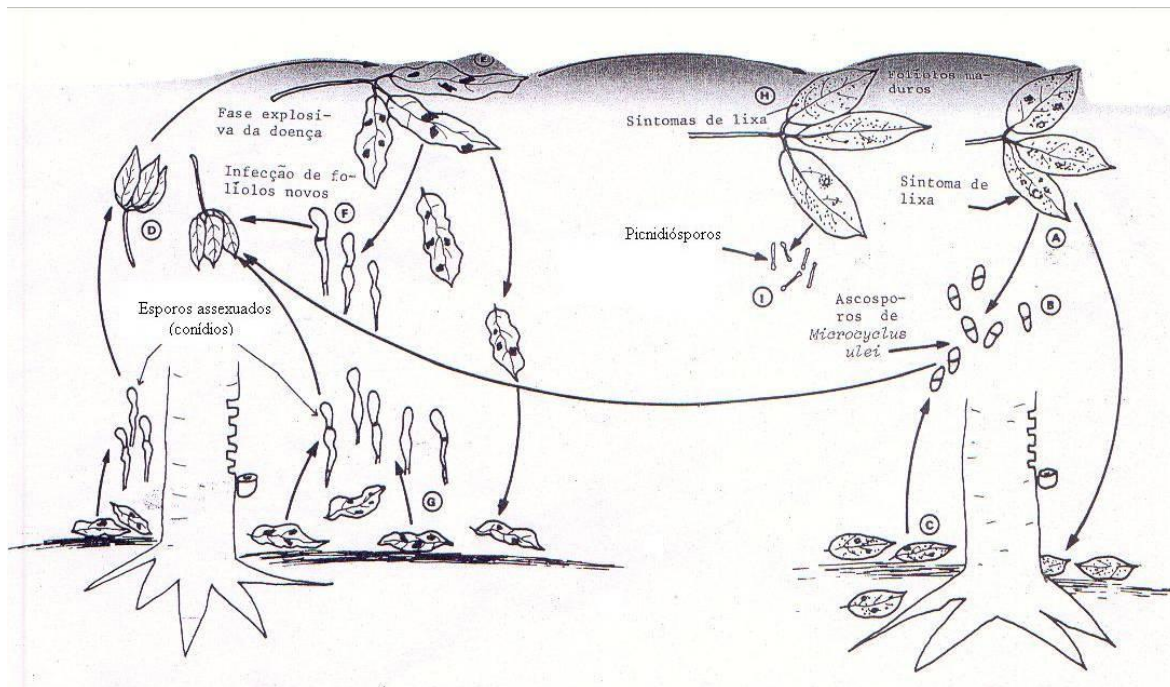


Figura 3. Ciclo de vida do *M.ulei* na seringueira.
Fonte: Gasparotto; Ferreira, 1989.

**A****B**

Figura 4. Sintomas da SALB na lâmina foliar de *Hevea brasiliensis* (linhagem CDC 943). Fotos cedidas pela PMB. A – Lesões conidiais características da fase assexuada do ciclo de vida do *M. ulei* na seringueira; B – Corpos estromáticos bem desenvolvidos em fase sexuada do ciclo do *M. ulei* na seringueira.

2.2.3 Principais formas de controle do *M. ulei*

A SALB pode ser controlada de modo satisfatório através do uso de fungicidas para seringueiras jovens ao nível de viveiros e jardins clonais (ROMERO, 2006). Entretanto, o uso de produtos químicos em plantas adultas de plantações industriais é muito limitado devido a dificuldades nas aplicações dessas substâncias, relacionadas à elevada altura das árvores adultas de seringueira (NILTON et al., 1992), além das condições climáticas e topográficas inadequadas para pulverizações com equipamentos tratorizados, elevando os gastos para a sua aplicação (JUNQUEIRA et al., 1988b). Clones de *Hevea* respondem de maneira diferente ao controle químico, sendo dependentes do nível de resistência parcial das diferentes raças de *M. ulei* (ROMERO, 2006).

Segundo Gasparotto et al. (1997), a utilização de clones resistentes e produtivos é a medida mais eficiente de controle da doença. Entretanto, a grande maioria dos trabalhos de melhoramento foi conduzida sem prévio conhecimento detalhado da variabilidade fisiológica do patógeno. Com isso, alguns clones têm se mostrado suscetíveis ao *M. ulei*, quando plantados sob diferentes condições ambientais. De acordo com os mesmo autores, essa suscetibilidade clonal pode ser devida às diferenças macro ou microclimáticas entre as regiões e/ou às variações do patógeno, como as diferenças na taxa de esporulação.

Normalmente os clones de seringueira que apresentam características de resistência ao *M. ulei* não são muito produtivos. A combinação adequada entre as características de boa produtividade e tolerância ao fitopatógeno pode ser obtida através da técnica conhecida como enxertia de copa. Nessa técnica, enxerta-se um clone de copa altamente resistente sobre o clone de painel bastante produtivo. Alguns estudos têm evidenciado que a enxertia de copa provoca uma ação depressiva na produção. Contudo, nas áreas de alta incidência de *M. ulei* esta técnica é aplicada como alternativa viável para o cultivo da seringueira (GASPAROTTO et al, 1997).

O controle de *M. ulei* através plantio de seringueira em áreas com condições ambientais desfavoráveis para o patógeno (áreas de escape) tem permitido o desenvolvimento e a produção econômica de seringueiras. Nestas áreas, os folíolos da planta, na época do refolamento, permanecem molhados por orvalho ou chuva por um curto período de tempo, o que resulta em baixos níveis de infecção do fitopatógeno (GASPAROTTO et al., 1997).

Uma alternativa que se tem buscado é o controle biológico através da aplicação do fungo *Dicyma pulvinata* o qual vem demonstrando eficiência no antagonismo ao *M. ulei* (MELLO et al., 2005; MELLO et al., 2006; ROMERO, 2006). Este fungo coloniza as lesões estromáticas originadas do *M. ulei*, causando a destruição das estruturas sexuadas do patógeno e, em consequência, diminuindo o desfolhamento da planta e a possibilidade de reinfecções (JUNQUEIRA; GASPAROTTO, 1991). Recentemente, Mello et al. (2006) identificaram 52 isolados de *D. pulvinata* provenientes de diferentes regiões do Brasil e constatou que estes isolados são promissores como controladores biológicos de *M. ulei*. Pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vêm estudando as características biológicas deste fungo e o seu potencial como controlador biológico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia do presente estudo foi realizada conforme ilustrado na Figura 5 e suas etapas estão descritas nos subitens a seguir.

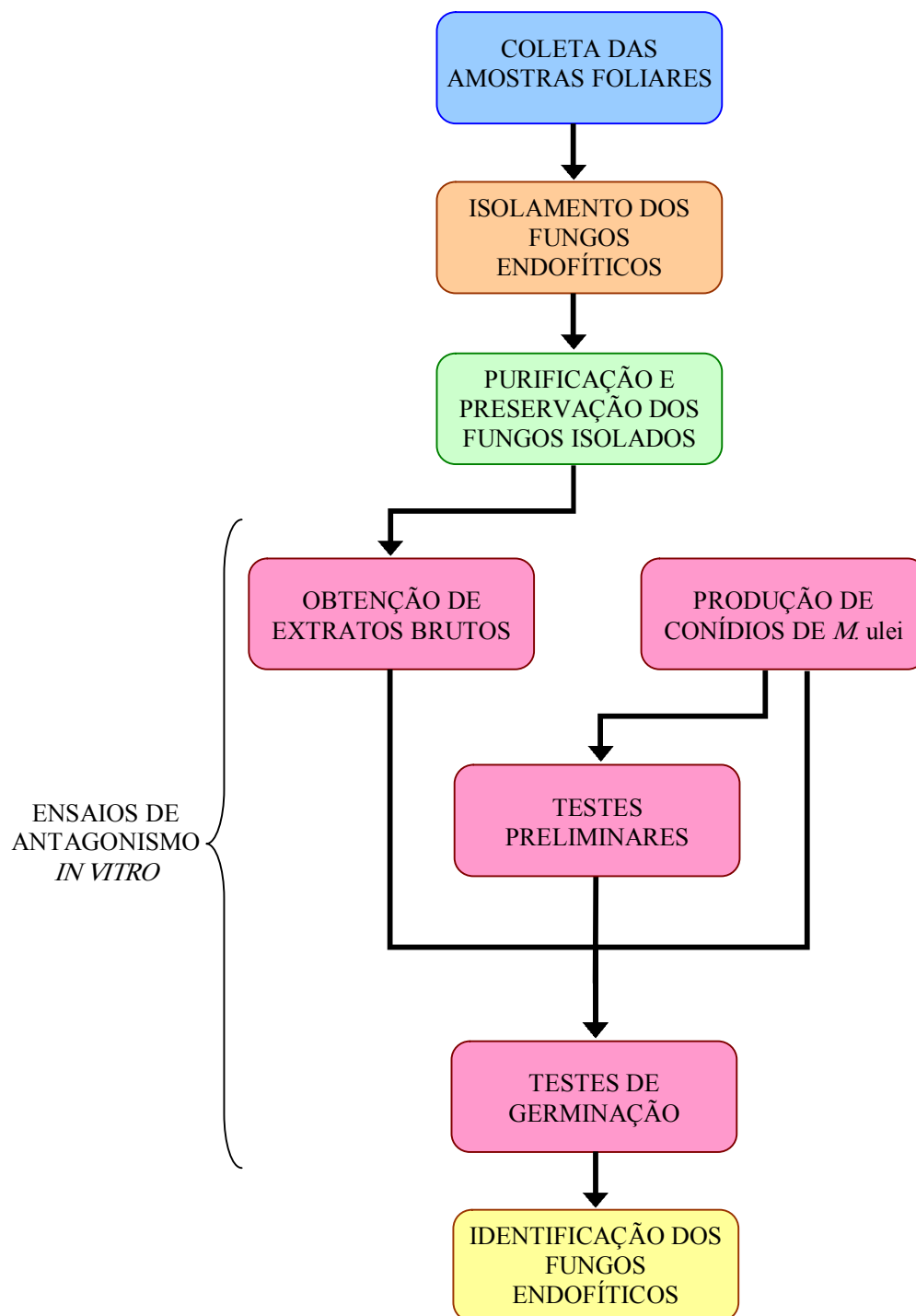


Figura 5. Fluxograma da metodologia empregada no presente trabalho.

3.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DE COLETA

Amostras foliares jovens e adultas, aparentemente sadias, correspondentes, respectivamente, aos estágios C e D, descritos por HALLÉ et al. (1978), foram coletadas a partir de ramos laterais da copa de árvores pertencentes às variedades FX3864, CDC312 e MDF180 de *H. brasiliensis* (Figura 6A e B), classificadas em relação ao desenvolvimento do *M. ulei*, respectivamente, como suscetível, parcialmente resistente com o parasita completando o seu ciclo de vida na planta, e parcialmente resistente com o parasita não completando seu ciclo de vida no hospedeiro (GARCIA et al., 2004; PMB comunicação pessoal) (Tabela 1). A coleta (Figura 6B) foi realizada em uma área de 5.000 ha., pertencente a Plantações Michelin da Bahia (PMB), localizada no município de Igrapiúna (9°13' S, 2°39' W), região sudeste da Bahia. De cada variedade, foram selecionados cinco indivíduos para a retirada do material vegetal, totalizando uma amostragem de quinze plantas de *H. brasiliensis*, devidamente georreferenciadas (Figura 6C) e marcadas (Figura 6D). Os dados de localização geográfica dos 15 indivíduos coletados são demonstrados no apêndice do presente trabalho. Todas as áreas de coleta foram homogêneas quanto ao relevo, altitude e tipo de solo (como sabemos disso? Informação da PMB? Se for tem que ser explicitado aqui), além de estarem situadas em locais distantes de estradas ou caminhos de modo a reduzir a interferência antrópica. Após a coleta, as amostras foliares foram acondicionadas em sacos etiquetados e imediatamente conduzidas ao Laboratório de Fitopatologia da PMB para o procedimento de isolamento dos fungos endofíticos.

Tabela 1: Descritivo agrônômico dos clones utilizados para amostragem dos fungos endofíticos conforme informações cedidas pela PMB

DADOS AGRONÔMICOS	FX3864	CDC312	MDF180
Parentais	PB86 x FB38	Avros308 x MDX40	Clone primário
Áreas de cultivo	Regiões com SALB	Regiões com SALB	Pouco cultivado
Resistência/susceptibilidade ao SALB	Susceptível	Parcialmente resistente	Parcialmente resistente
Nota de intensidade de esporulação do <i>M. ulei</i> (escala de 1 a 6, segundo Junqueira, 1988a, com adaptações)	6	4	4
Nota de densidade de estromata de <i>M. ulei</i> (escala de 0 a 4, segundo Junqueira, 1988a, com adaptações)	4	2	0
Potencial de produção em área de <i>M. ulei</i> em árvore adulto (Kg borracha seca /ha.ano)	800 - 1200	1200 – 1500	500 – 800
Área de recomendação para plantio	Recomendado ainda em regiões com baixa pressão de <i>M. ulei</i>	Recomendado para regiões com alta pressão de <i>M. ulei</i>	Não recomendado por causa da baixa produção

Avros: Algemeene Vereniging Rubberplanters Oostkust Sumatra. FX: Cruzamento Ford; CDC: Clones oriundos de polinizações manuais entre clones resistentes ao SALB (*Dothidella*) e clones susceptíveis ao SALB, o C final significa Clavellinas. MDF: Madre de Dios Firestone; MDX Madre de Dios Cruzamento; PB: Prang Bezar; FB: Ford Brazil.



A



B



C



D

Figura 6. Coleta das amostras foliares. A – clones de seringueira nas PMB; B – coleta das folhas com o auxílio de um podão; C – georreferenciamento; D – marcação das plantas coletadas.

3.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Inicialmente, foram selecionadas seis folhas a partir do material vegetal coletado de cada planta (Figura 7), retirando-se um folíolo de cada uma delas, de modo a serem obtidos seis folíolos para o isolamento dos fungos endofíticos.



Figura 7. Amostras foliares selecionadas de um indivíduo da variedade MDF180 de *H. brasiliensis*.

3.2.1 Desinfecção superficial

Os folíolos selecionados foram primeiramente submetidos a um procedimento de desinfecção superficial, com o objetivo de eliminar a sujeira e a maior parte dos fungos epifíticos e saprófitos comumente presentes na superfície de tecidos vegetais. Para isso, as amostras foram inicialmente lavadas com água corrente para a retirada da poeira acumulada na superfície foliar. Em seguida, estas passaram por um tratamento com diferentes agentes químicos para a desinfecção das superfícies foliares, sendo submersas, sucessivamente, em: solução de álcool etílico a 70% v/v por 1 minuto, seguido da imersão em solução de hipoclorito de cálcio a 3% m/v por 5 minutos (Figura 8). Após o tratamento químico, as amostras foram lavadas por três vezes em água destilada estéril aproximadamente por 1 minuto para cada lavagem. Logo após a última lavagem, retirou-se, com o auxílio de um bisturi esterilizado, o ápice e a base de cada

folíolo, que foram descartados (Figura 9). Para o isolamento dos fungos endofíticos foi utilizada apenas a parte central dos folíolos.



Figura 8. Desinfecção superficial dos folíolos de *H. brasiliensis*- Tratamento químico com hipoclorito de cálcio a 3% m/v.



Figura 9. Corte do ápice e da base de um folíolo.

Como controle do procedimento de desinfecção superficial, as regiões adaxial e abaxial da porção mediana de cada folíolo foram impressas em placas contendo o meio BDA (Ágar Batata - Dextrose) suplementado com o antibacteriano cloranfenicol (100 µg/mL) e o corante fungistático rosa de bengala (25 µg/mL).

3.2.2 Método de isolamento

O isolamento dos fungos endofíticos realizou-se com base na metodologia de Maitan (1998). As lâminas foliares, após a desinfecção superficial, foram maceradas em cadinhos estéreis com 5,0 mL de solução tampão fosfato de cálcio a 0,5 M (Figura 10). Em seguida, o caldo resultante da maceração, ou seja, o extrato foliar foi espalhado assepticamente, com o auxílio de uma alça de Drigalsky (Figura 11), sobre a superfície dos meios BDA, ISP-2 (Ágar extrato de malte e extrato de levedura) e ISP-3 (Ágar aveia e traços de sais), suplementados com o cloranfenicol (100 µg/mL) e rosa de bengala (25 µg/mL). O plaqueamento foi realizado em duplicata para cada meio utilizado. As placas contendo o extrato foliar foram incubadas em estufa do tipo B.O.D. (Modelo 347 CD, FANEM) a 28°C, até o crescimento das colônias fúngicas, período 7 a

15 dias, quando, então, foram mantidas sob refrigeração a 4-8°C, para posterior purificação e preservação dos isolados.

Durante o isolamento, placas de Petri (15 x 100mm), descartáveis de poliestireno, contendo meio BDA também suplementado com cloranfenicol e rosa de bengala, foram abertas e deixadas expostas em um local próximo a cabine de fluxo laminar, servindo como controle de contaminação do ambiente do laboratório onde os isolamentos foram realizados.



Figura 10. Extrato foliar macerado com 5,0 mL de solução tampão fosfato de sódio a 0,5 M em condições assépticas.

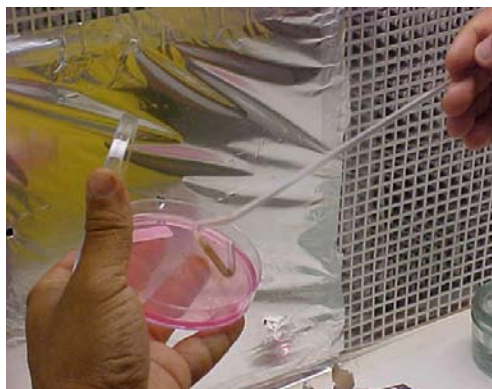


Figura 11. Extrato foliar sendo espalhado assepticamente sobre o meio BDA, suplementado com cloranfenicol (100 µg/mL) e rosa de bengala (25 µg/mL), com auxílio de uma alça de Drigalski.

3.3 PURIFICAÇÃO, PRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DAS COLÔNIAS DE FUNGOS ISOLADOS DE *H. brasiliensis*

Após o período de incubação, os isolados foram repicados em placas contendo meio BDA, suplementado com cloranfenicol, para a obtenção de culturas puras. Estas placas foram mantidas em B.O.D. a 28°C. A preservação dos isolados purificados foi realizada através da técnica de Castellani (1967), por meio da transferência de pequenos discos de micélio e ágar das culturas puras para tubos de vidro lacrados, previamente esterilizados, contendo água destilada estéril, sendo mantidos em temperatura ambiente (Figura 12). Para a reativação dos fungos preservados, um disco foi retirado, sob condições assépticas, e colocado em uma placa de Petri contendo o meio BDA. Este inóculo foi então incubado em B.O.D., 28°C por 5 a 10 dias, e verificado, após esse tempo, o crescimento e possíveis contaminações.

A frequência de isolados de fungos endofíticos purificados em relação aos meios utilizados e as variedades de *H. brasiliensis* estudadas foi analisado através de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey com o programa PAST, versão 1.34 (HAMMER et al., 2001), adotando-se o nível de significância de 5% para interpretação dos resultados.

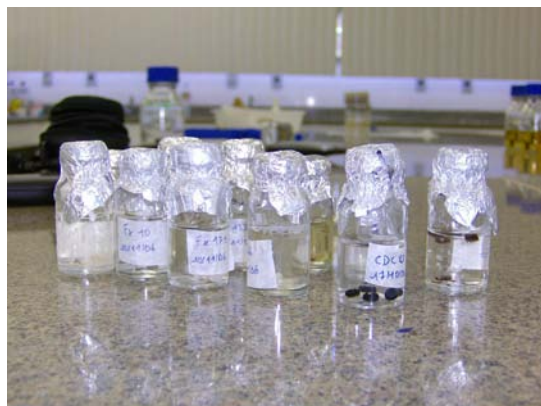


Figura 12. Preservação e manutenção dos fungos endofíticos isolados de *H. brasiliensis* em tubos de vidro lacrados (segundo Castellani, 1967).

3.4 ANTAGONISMO *IN VITRO*

Os ensaios de antagonismo *in vitro* dos fungos endofíticos recuperados de *H. brasiliensis* contra o *M. ulei* foram observados através de testes de germinação de conídios (esporos assexuados) das variedades fisiológicas *M. ulei* PMB 26 e *M. ulei* PMB 28 (pertencentes ao Laboratório de Fitopatologia da PMB), retirados de plantas previamente infectadas. Para isso, foram preparadas soluções de 200 µL contendo: água destilada estéril; tween a 0,5%; extrato bruto obtido a partir do crescimento do fungo endofítico em meio de cultivo líquido Extrato de Malte (EM); e conídios viáveis em concentração de 100 unidades/µL. A concentração do extrato bruto utilizado nas soluções foi definida após a realização de testes de germinação preliminares, que visaram verificar a influência do EM na germinação dos conídios, de modo a não haver interferência significativa deste meio nos resultados dos testes com o extrato bruto. Para todos os testes de germinação utilizou-se como controle soluções contendo apenas água destilada estéril, tween (0,05%) e os conídios de *M. ulei* (100 unidades/µL). Optou-se em não se testar a influência de tais extratos sobre o corpo micelial do *M. ulei* pelo fato deste fitopatógeno apresentar um crescimento *in vitro* bastante lento, requerendo um período de tempo que poderia degradar os possíveis metabólitos bioativos presentes nos extratos brutos a serem testados.

Os procedimentos realizados nos ensaios estão detalhados nos itens a seguir.

3.4.1 Obtenção do extrato bruto

As etapas para a obtenção dos extratos brutos a serem utilizados nos testes de germinação estão ilustradas na Figura 13. Inicialmente, os fungos a serem testados foram inoculados em placas contendo meio BDA que foram mantidas a 28°C, durante 7 a 10 dias. Após o período de incubação, foram retirados de cada placa seis cilindros de ágar de 5 mm de diâmetro da região periférica da colônia fúngica em crescimento, os quais foram colocados em um frasco reagente, com capacidade para 250 mL, contendo 120 mL de caldo EM (água e extrato de malte a 1%). Cada frasco reagente foi mantido em estufa incubadora tipo B.O.D. a 28°C por 10 dias. Após este período, 100 mL do

caldo foram passados em filtro de papel T 103 (Mellita) para a retirada da maior parte do micélio, sendo este volume, em seguida, acondicionado em ultrafreezer a -80°C (marca Nuaire, modelo 6382) por 24 horas para liofilização (marca Jouan, modelo LP3). O material liofilizado foi ressuspendido em 4 mL de água destilada estéril e filtrado em membrana poliestersulfônica de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de malha. O volume final obtido foi mantido em ultrafreezer a -80°C , até a sua utilização nos testes de germinação.

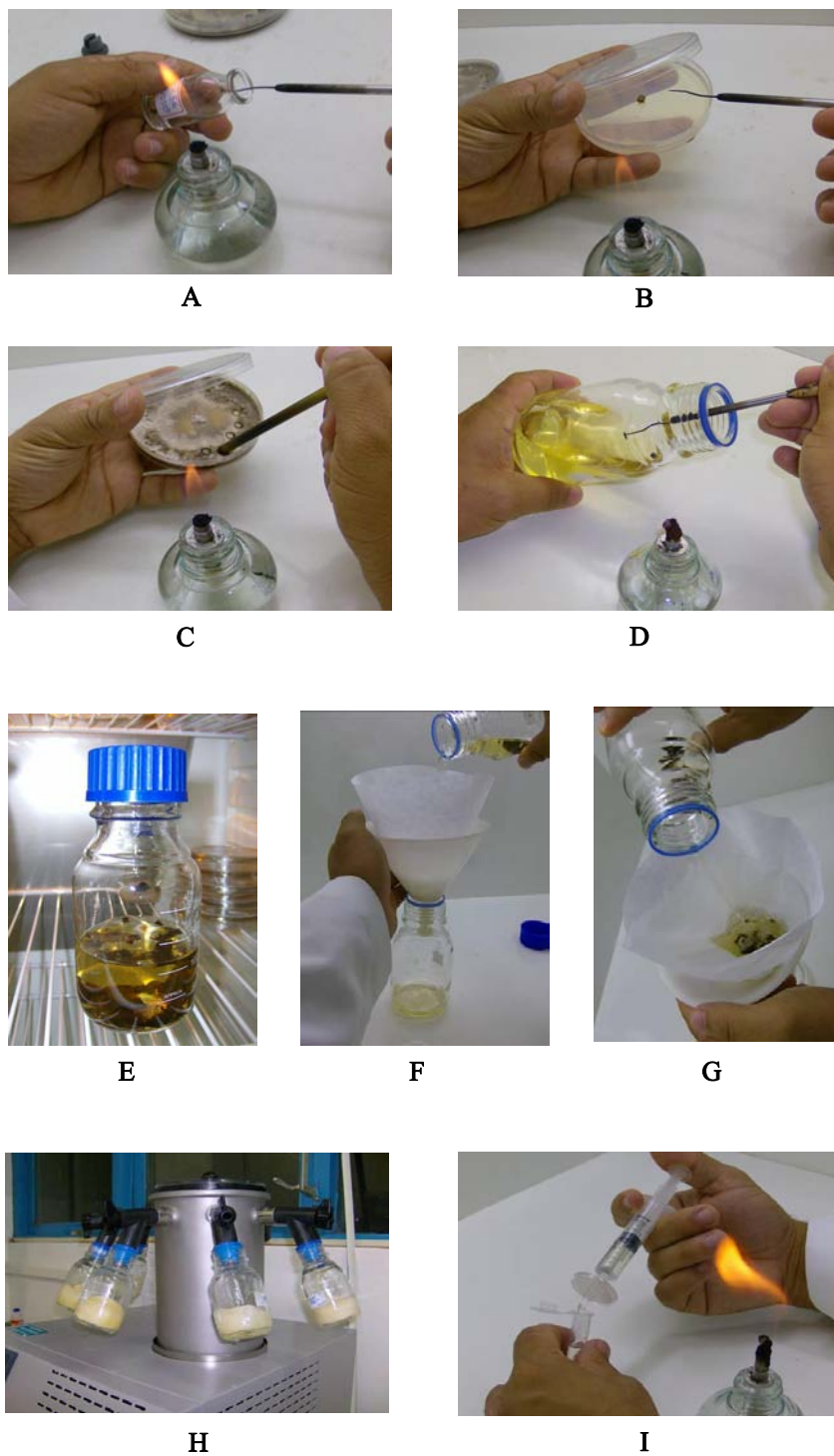


Figura 13. Produção e processamento do extrato bruto. A – retirada de um cilindro de meio de cultura contendo a o fungo endofítico crescido de frasco lacrado contendo água destilada estéril (preservação por Castellani, 1967); B – inóculo do cilindro com a cultura do fungo em BDA; C – Obtenção dos cilindros de 5 mm de cultura do fungo na borda da colônia; D – inoculação de cilindro em meio líquido EM para crescimento do fungo endofítico; E – frasco reagente contendo fungo crescendo em EM; F e G – filtração do extrato bruto, em filtro de papel, obtido após crescimento do fungo endofítico por 10 dias em caldo EM; H – liofilização dos extratos brutos filtrados; I – filtração do extrato bruto em membrana poliestersulfônica 0,22 μm .

3.4.2 Produção dos conídios

Plantas de seringueira altamente suscetíveis ao *M. ulei*, pertencentes à linhagem PB314, foram infectadas durante o segundo ou terceiro lançamento foliar para posterior retirada dos esporos a serem testados. A infecção ocorreu através da pulverização de soluções aquosas, contendo tween a 0,5% e conídios viáveis de *M. ulei* PMB 26 e *M. ulei* PMB 28 (em concentração de 2×10^5 unidades por mL determinada após contagem em Câmara de Neubauer), na face abaxial de folíolos, quando em idade de seis a oito dias (correspondente ao estágio foliar B₁ ou B₂, descritos por HALLÉ et al., 1978), utilizando-se, para isto, um atomizador (Modelo H3) (Figura 14A) acoplado em um compressor elétrico. A atomização foi efetuada até a cobertura completa dos folíolos por pequenas gotículas, até antes de atingir o ponto de escorrimento para evitar a contaminação dos outros folíolos. As plantas foram mantidas em câmara úmida (Figura 14B), com umidade relativa de $96 \pm 2\%$ a 24°C, sob regime de luminosidade alternada de 12 horas de escuro e 12 horas de luz artificial (lâmpadas fluorescentes – 40W) por aproximadamente 15 dias. Após este período, os conídios foram coletados, com o auxílio de um pincel fino, a partir de lesões contidas nos folíolos infectados (Figura 14C) e colocados em tubo de ensaio contendo 1 mL de água destilada estéril e tween a 2%. Os conídios foram quantificados com o auxílio de uma Câmara de Neubauer, e a solução foi ajustada para a concentração de 4×10^5 conídios por mL, a ser utilizada durante os testes de germinação com os extratos brutos e controles.

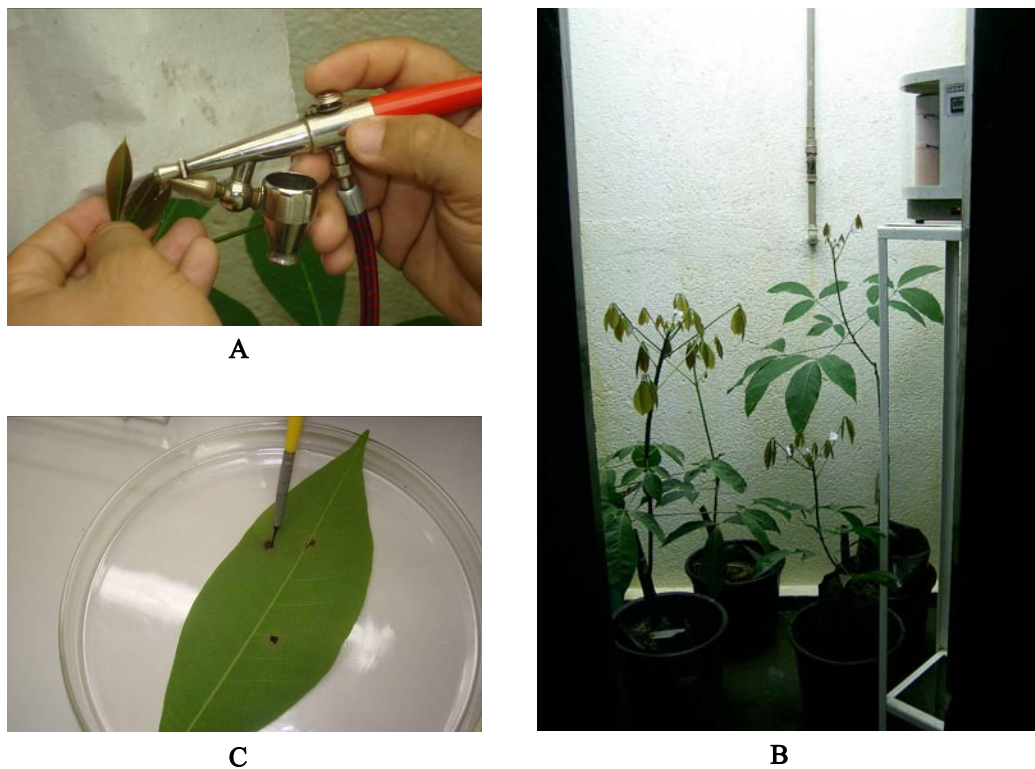


Figura 14. Produção de esporos assexuados do *M. ulei* PMB26. A – pulverização de conídios na face abaxial do folíolo de *H. brasiliensis* variedade PB314 com o auxílio de um atomizador; B – acondicionamento de plantas em câmara úmida; C – retirada dos conídios com auxílio de um pincel fino.

3.4.3 Influência do meio de cultivo Extrato de Malte sobre a germinação dos conídios de *M. ulei*PMB26 e *M. ulei*PMB28

Inicialmente, preparou-se 100 mL do meio líquido EM (1%), o qual foi mantido em estufa incubadora a 28°C por 10 dias, ou seja, as mesmas condições de crescimento dos fungos endofíticos, porém sem o inóculo. Após este período, o meio líquido foi armazenado em ultrafreezer a -80°C até ser liofilizado. O material resultante da liofilização foi ressuspensionado em 4 mL de água destilada estéril e, em seguida, filtrado em membrana poliestersulfônica de 0,22 µm de malha. Após a filtração, o volume resultante foi mantido em ultrafreezer a -80°C. A partir do extrato concentrado do meio de cultura obtido neste procedimento, preparou-se 200 µL da suspensão de 100 unidades de conídios por µL em água destilada, tween 0,5%, e o produto filtrado em diferentes concentrações finais — 12,5%, 25%, 37,5%, 50%, 62,5% e 75% (p/v). Cada solução preparada foi utilizada em testes de germinação conforme metodologia descrita no item a seguir. Com os resultados obtidos nestes ensaios, foram definidas as concentrações de extrato de malte que não apresentaram influência significativa sobre a germinação dos conídios, quando comparadas ao controle (conídios ressuspensionados em água destilada estéril e tween 0,5%), escolhendo-se, a partir destas, a maior concentração dos extratos brutos que não apresentaram influência na germinação dos conídios para ser inicialmente utilizada nos testes de germinação.

Para se testar os efeitos de cada variável, foram realizadas análises de variância, através do programa SAS System 9.1 (SAS, 1989).

3.4.4 Teste de germinação dos conídios de *M. ulei* PMB26 e de *M. ulei* PMB28 produzidas em PB314 na presença do extrato bruto do meio de cultivo dos fungos isolados

A partir de cada solução-teste previamente preparada, foram inoculados alíquotas de 50 µL em quatro pontos da superfície de uma placa de Petri (Figura 15A) contendo 15 mL de ágar 1,5 %. Todas as placas testes foram colocadas em estufa incubadora a 24°C, por 12 horas. Após este período, adicionou-se Lactofenol de Aman (Solução de uso: 100 mL de lactofenol, 1 mL de azul de algodão aquoso 1%) sobre os pontos inoculados (Figura 15B), para facilitar a visualização dos conídios. Em cada ponto, selecionou-se um campo ao microscópio óptico em objetiva de 10X, no qual se realizou a contagem de conídios germinados em relação ao total observado (Figura 15C), e determinou-se então a porcentagem de germinação dos conídios de cada campo.

Para a análise dos dados obtidos nos testes de germinação, inicialmente testou-se se as distribuições de frequências das amostras são normais e as variâncias não diferem significativamente através dos testes de Shapiro-Wilks e o teste F (valores de $p > 0,05$). Posteriormente, comparou-se a diferença entre as médias dos grupos teste e controle, dois a dois, utilizando-se o teste do “t” de Student para amostras independentes, adotando-se o nível de significância de 5% para interpretação dos resultados. Assim, foram consideradas significativas as diferenças quando a probabilidade era igual ou inferior a 0,05 ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas através do programa PAST, versão 1.34 (HAMMER et al., 2001). Todos os testes de germinação que apresentaram resultados significativamente diferentes do controle em um primeiro ensaio foram repetidos em um segundo ensaio independente.

Os valores percentuais dos testes de germinação foram então utilizados para a obtenção da porcentagem de inibição dos extratos brutos sobre a germinação dos conídios. Para isso, foram realizados cálculos de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = [1 - (T/C)] \times 100$$

Onde T corresponde à média das porcentagens de germinação definidas na placa teste e C à média das porcentagens de germinação definidas na placa controle.

Os isolados que apresentaram efeito significativo (estimulatório ou inibitório) sobre a germinação dos conídios das duas variedades de *M. ulei* (PMB26 e PMB28) foram organizadas em grupos, conforme as médias percentuais de inibição, para facilitar a interpretação dos dados. Com isso, escolheu-se a categoria que agrupava os extratos brutos com maiores valores percentuais de inibição, os quais foram testados e analisados, nas mesmas condições anteriormente descritas, com menor concentração de extrato (12,5%), para se identificar entre eles os mais inibidores.

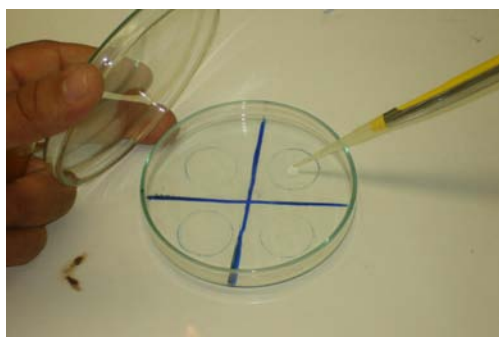
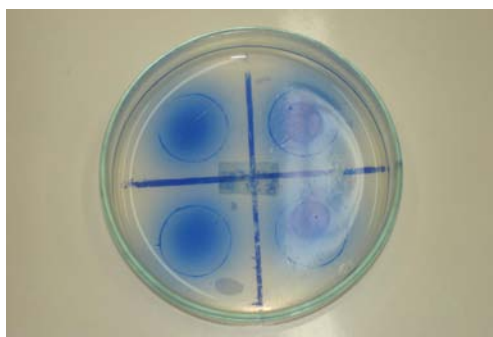
**A****B****C**

Figura 15. Teste de germinação. A – inoculação de solução aquosa (contendo tween 0,5%, conídios e extrato bruto) em placa teste com ágar; B – placa teste com a presença de Lactofenol de Aman, aplicadas 12 horas de incubação em BOD; C – observação e contagem dos conídios em microscópio óptico.

3.5 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA *M. ULEI*

Os isolados de fungos endofíticos que apresentaram significativa atividade antimicrobiana contra *M. ulei* foram identificados molecularmente através do sequenciamento da porção inicial do gene nuclear que codifica para o RNA ribossômico (rRNA) 25-28S e da região ITS (espaçador interno transcrito dos genes nucleares que codificam o rRNA).

O DNA dos isolados foi extraído a partir da raspagem da massa micelial crescida em meio de cultura sólido BDA. A massa micelial (50-60 mg) foi macerada com nitrogênio líquido em um pistilo com auxílio de um gral de porcelana, previamente esterilizados. O material pulverizado resultante foi transferido para microtubos de 1,5 mL, contendo 650 µL de tampão de extração aquecido a 65°C por 60 min. Utilizou-se o tampão de extração CTAB (brometo de N-acetil-n-n-n-trimetilamônio) modificado (100 mM Tris-HCl pH 8,1, 4 M NaCl, 2% CTAB, 20 mM EDTA, 1% PVP) (ROGERS, BENDICH, 1994). O DNA foi extraído uma vez com clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1), precipitado com isopropanol, e lavado com etanol 70%. A ressuspensão foi feita com TE previamente autoclavado.

A análise qualitativa e quantitativa do material extraído foi realizada por meio de eletroforese (DNA de fago-λ, digerido com Hind III) e de espectrofotometria ultravioleta nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Os géis de agarose foram preparados em TAE 1X com SYBR Safe (Invitrogen®) a 1:10.000, em concentrações de 1%. As amostras de DNA analisadas foram preparadas com o tampão de corrida bromofenol. A eletroforese foi feita em TAE 1X a 80 V, 70 mA e 70 W por 90 min. A visualização dos fragmentos de DNA foi visualizada através de transiluminador de luz ultravioleta. Após a corrida, os géis foram fotografados com o sistema de fotografia digital KODAK EDAS 290.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) simétrica foi à técnica empregada para amplificar os fragmentos-alvo. As amplificações foram realizadas em um volume final de 25 µL, e com as seguintes concentrações finais: tampão de amplificação a 1X, dNTPs a 10 mM, MgCl₂ a 2,5 mM, iniciadores a 0,5 pMol/µL, 0,1-10 ng de DNA genômico, Taq DNA Polymerase a 0,02 U/µL da Invitrogen®, betaína 1 M (somente

para a região ITS), DMSO e água ultrapura autoclavada (q.s.p. 25 µL). Para a amplificação da porção inicial 5' do gene do rDNA nuclear 25-28S foram utilizados os iniciadores LR0R direto (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') e LR5 reverso (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3'), enquanto que para a amplificação do espaçador interno transcrito (ITS) foram utilizados os iniciadores ITS1 direto (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') de acordo com White et al. (1990). Os parâmetros das reações de amplificação para a região 25-28S seguiram o proposto por Gardes e Bruns (1993): 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 1 min e 25 seg, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 35 seg, anelamento a 55°C por 55 seg, e extensão a 72°C por 2 min, além de 1 ciclo final de extensão a 72°C por 10 min. Para a região ITS, utilizaram-se os seguintes parâmetros: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, seguido por 28 ciclos de 95°C por 1 min (desnaturação), anelamento a 50°C por 1 min, e extensão a 72°C por 3 min, além de 1 ciclo final de extensão a 72°C por 7 min. Controles negativos, sem DNA, foram preparados em cada uma das diversas séries de amplificação para se excluir a possibilidade de contaminação dos reagentes.

Após o término da reação, 3,0 µL de cada amostra amplificada foi submetida à eletroforese em géis de agarose, na concentração de 1%, preparados em TAE 1X com SYBR Safe Invitrogen® a 1:10000. As amostras de DNA para a análise em gel foram preparadas com o tampão de amostra azul de bromofenol (SAMBROOCK, RUSSELL, 2001). A eletroforese foi feita em TAE 1X com 70 V, 60 mA e 60 W por 90 min. A visualização da separação e registro fotográfico dos fragmentos de DNA foi realizado conforme descrito anteriormente.

Os produtos de PCR foram purificados com kit PureLink Invitrogen®, adicionando-se 4X de tampão de ligação (fornecido pelo fabricante) com isopropanol para cada volume de produto de PCR (50-100 µL) contidos em uma coluna PureLink acoplada em um tubo de 1,5 mL. Em seguida, o material foi centrifugado em temperatura ambiente por 1 min. a 10.000 g, e a coluna transferida para um novo tubo. Adicionou-se 650 µL de tampão de lavagem (fornecido pelo fabricante) com etanol, seguindo para uma nova centrifugação, e após o descarte da solução filtrada, procedeu-se a uma nova centrifugação a 10.000 g, por 3 min. para total remoção do tampão. A coluna foi transferida para um tubo de 1,7 mL, e adicionou-se 50 µL de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) fornecido pelo fabricante. O material foi incubado por 1 min. e em

seguida centrifugado por 2 minutos a 10.000 g. A coluna foi descartada e o material recuperado, contendo a amostra de DNA purificada (48 µL), que foi armazenada a 20°C, de acordo com as instruções do fabricante.

Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados diretamente. Os mesmos iniciadores utilizados para amplificação da região 25-28S e ITS foram também utilizados como iniciadores nas reações de seqüenciamento, respectivamente. O processo de seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Escola de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ), localizado no município de Piracicaba, São Paulo.

Após o seqüenciamento, os eletroferogramas foram analisados visualmente e os *contigs* de cada par de seqüências (sentido direto e reverso) foram montados e editados através do programa SEQMAN do pacote LASERGENE 7.2 (DNASTAR, 2006). Os *contigs* e as seqüências únicas (que não formaram *contigs*) editadas foram submetidas à análise comparativa por similaridade com seqüências nucleotídicas correspondentes, já depositadas no GenBank, através do programa BLASTn (versão 2.2.16) disponível no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

4.1.1 Desinfecção superficial

O método utilizado de desinfecção superficial dos folíolos mostrou-se eficaz, uma vez que de um total de 15 placas controle (correspondendo aos 15 indivíduos coletados e processados), somente três apresentaram possíveis fungos contaminantes. Além disso, todos os isolados existentes nessas placas foram macroscopicamente semelhantes entre si e caracterizados morfolologicamente como pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Contudo, não é possível afirmar que esses isolados fúngicos sejam realmente contaminantes, já que espécies do gênero *Aspergillus* são comumente isolados como endofíticos (STAMFORD et al., 1998; SOUZA et al., 2004; PIMENTEL et al., 2006; SILVA, 2006). A desinfecção superficial é uma etapa essencial para o isolamento dos fungos endofíticos, pois facilita a chance de recuperação de espécies endofíticas eliminando contaminações por esporos de fungos e células bacterianas presentes na superfície do tecido vegetal (BILLS; POLISHOOK, 1994a; PAULUS et al., 2003).

4.1.2 Isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos

A partir das amostras foliares coletadas em 15 plantas de *H. brasiliensis* foi possível o isolamento e a purificação de um total de 435 isolados fúngicos (Tabela 2). Considerando a amostragem utilizada no presente trabalho verificou-se um número elevado de fungos recuperados, o que corrobora com resultados obtidos em outros trabalhos de isolamento de fungos endofíticos em plantas tropicais (BILLS; POLISHOOK, 1994a, 1994b; POLISHOOK et al., 1996; ABREU, 2005). Conforme afirmado por Souza (2004), este fato pode ser justificado ao considerar que as folhas dos vegetais hospedeiros constituem provavelmente a primeira porta de entrada para os microrganismos, por apresentarem tecidos mais frágeis e expostos pela presença de

estômatos. Entretanto, em termos de diversidade, os métodos de isolamento comumente utilizado na literatura provavelmente subestimam a população total de microrganismos, uma vez que foram somente selecionados fungos capazes de se desenvolverem nos meios de cultura utilizados. Tais limitações se aplicam à maioria dos estudos baseados em métodos de plaqueamento, embora eles forneçam indicações relativas da estrutura da população microbiana. Nenhuma das placas de Petri, contendo meio de cultura (BDA), utilizadas como controle do ambiente durante o processo de isolamento dos fungos endofíticos apresentou o crescimento microbiano, não havendo então evidências de contaminação exógena.

Tabela 2: Número de fungos filamentosos isolados e purificados de acordo com a variedade de *H. brasiliensis* estudada e o meio de cultura utilizado para o isolamento

Variedades de <i>H. brasiliensis</i>	Nº DE FUNGOS PURIFICADOS			Total por variedade de <i>H. brasiliensis</i>
	BDA	ISP-2	ISP-3	
FX3864	78	78	42	198
CDC312	63	23	53	139
MDF180	42	34	22	98
Total por meio	183	135	117	435

A técnica de isolamento por maceração das amostras foliares, adotada no presente trabalho, contribuiu para o aumento de superfície de contato das estruturas fúngicas, presentes no material vegetal, com o meio de cultura. Segundo Abreu (2005) este procedimento aumenta a chance de recuperação de um maior número de espécies endofíticas, inclusive àquelas menos abundantes no tecido vegetal.

Quando o crescimento das colônias foram visualizadas nas placas de isolamento, foi possível observar basicamente duas situações: 1) colônias que cresceram uma em direção à outra, e só cessaram o crescimento quando as colônias se tocam (Figura16A). Esse tipo de interação foi observado principalmente nas colônias presentes nas placas que continham o material vegetal das variedades MDF180; 2) colônias que cresceram uma em direção à outra, e quando se encontram, há sobrecrecimento de uma em relação à outra (Figura16B). Este comportamento foi observado na maioria das placas de isolamento dos fungos provenientes da variedade FX3864. Essa situação foi relatada por Maki (2006) em estudo de isolamento de fungos endofíticos de cacau, segundo o

qual tal comportamento pode ser indicativo de uma possível relação de parasitismo entre estes fungos. No presente trabalho, após avaliação microscópica desses isolados, não se verificou quaisquer indícios de parasitismo, tais como o enovelamento das hifas dos fungos observado com o aparecimento de estruturas semelhantes a nós, característica típicas de uma relação de parasitismo.

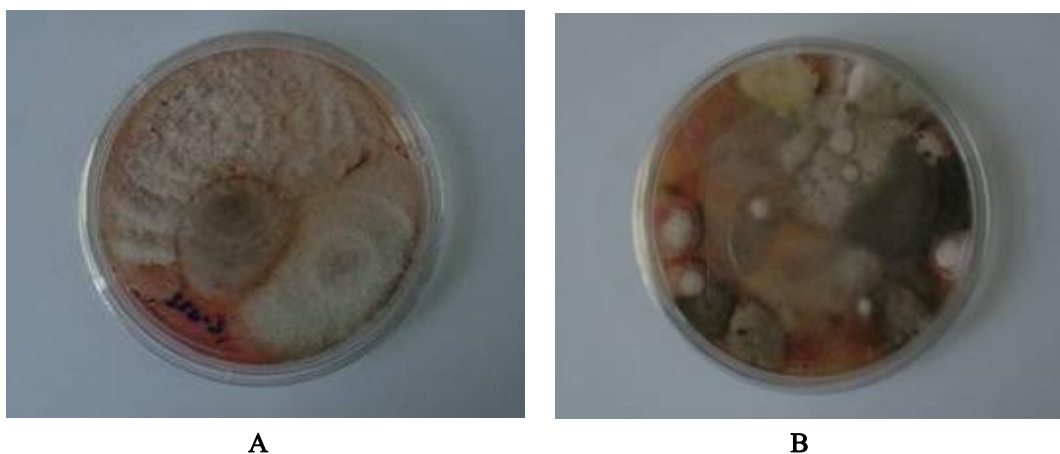


Figura 16: Comportamento das colônias em placas de isolamento após um período determinado de incubação em B.O.D. a 28°C. A – Espécimes fúngicos isolados em meio ISP-2 após 14 dias de incubação, com crescimento limitado entre si; B – Espécimes fúngicos isolados após 8 dias de incubação, demonstrando sobreposição das colônias fúngicas.

Em relação às variedades de *H. brasiliensis*, observou-se uma tendência de diminuição no número total de isolados de fungos endofíticos obtidos da variedade mais suscetível (FX3864) para a mais tolerante (MDF180) ao *M. ulei*. Quando analisadas separadamente, esta tendência foi também evidente apenas no meio BDA, enquanto que nos outros meios esse padrão não foi observado (Tabela 2).

Com relação ao isolamento dos fungos nos três meios de cultura utilizados, observou-se que, com exceção do apresentado pela variedade CDC312, houve um menor número de isolados no meio ISP-3 (Tabela 2).

Os dois conjuntos de dados da Tabela 2 foram inicialmente submetidos ao teste de Levene e ambos apresentaram homogeneidade de variância, $p=0,283$ para as três variedades estudadas e $p=0,3746$ para os três meios de cultura utilizados. Com isso, esses conjuntos de dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre o número de isolados de fungos endofíticos nas três diferentes variedades de *H. brasiliensis*.

estudadas ($p=0,1526$), nem entre o número de isolados de fungos endofíticos nos três diferentes meios de cultura estudados ($p=0,4847$).

Dentre os espécimes purificados, cerca de 60% não produziram estruturas de reprodução desenvolvidas em meio de cultura de purificação, nas condições utilizadas neste trabalho. Observou-se a predominância de fungos de micélio algodinoso e de coloração branca. A maioria destes fungos apresentou crescimento lento. Isto pode ocorrer principalmente devido ao fato de os microrganismos não encontrarem no meio sintético as mesmas condições nutricionais presentes no interior da planta hospedeira. Embora tenham sido predominantes no isolamento *in vitro*, os isolados de crescimento lento não necessariamente se encontram em maior número sob condições naturais, ou seja, no interior do hospedeiro em campo (ABREU, 2005), uma vez que os meios de cultivo utilizados para o isolamento de microrganismos não conseguem simular as mesmas condições do interior da planta hospedeira. Segundo Carroll (1995), pouco se sabe sobre o comportamento competitivo das espécies dentro do hospedeiro e na presença de outras espécies de microrganismos.

No presente trabalho, foi possível a reativação de mais de 90% dos fungos endofíticos preservados, mostrando a eficácia da técnica de preservação em água destilada estéril ao menos para os isolados recuperados. A utilização deste método teve a finalidade de manter as características originais dos fungos purificados uma vez que pode ocorrer perda da capacidade da produção de metabólitos secundários por alguns fungos endofíticos após repiques sucessivos (MENEZES; ASSIS, 2004). Além disso, observou-se que alguns isolados tendem a perder a viabilidade muito rapidamente, quando cultivados *in vitro*. Esta técnica de preservação foi descrita primeiramente por Castellani (1967) para a preservação de fungos de interesse médico, do gênero *Candida*, *Geotrichum*, *Cladosporium*, dentre outros. A partir de trabalhos conduzidos por Figueiredo et al. (1975), os quais utilizaram este método com sucesso para a preservação de fungos fitopatogênicos, esta técnica se difundiu como uma forma eficiente de preservação de estruturas fúngicas sendo, atualmente, bastante utilizada para a preservação de fungos endofíticos (ABREU, 2005). Constitui um processo simples e econômico, substituindo o meio de cultura por água destilada esterilizada, sendo importante para a manutenção da viabilidade do fungo por longo prazo, o que permite a aplicação dos preservados fúngicos em trabalhos futuros de bioprospecção química.

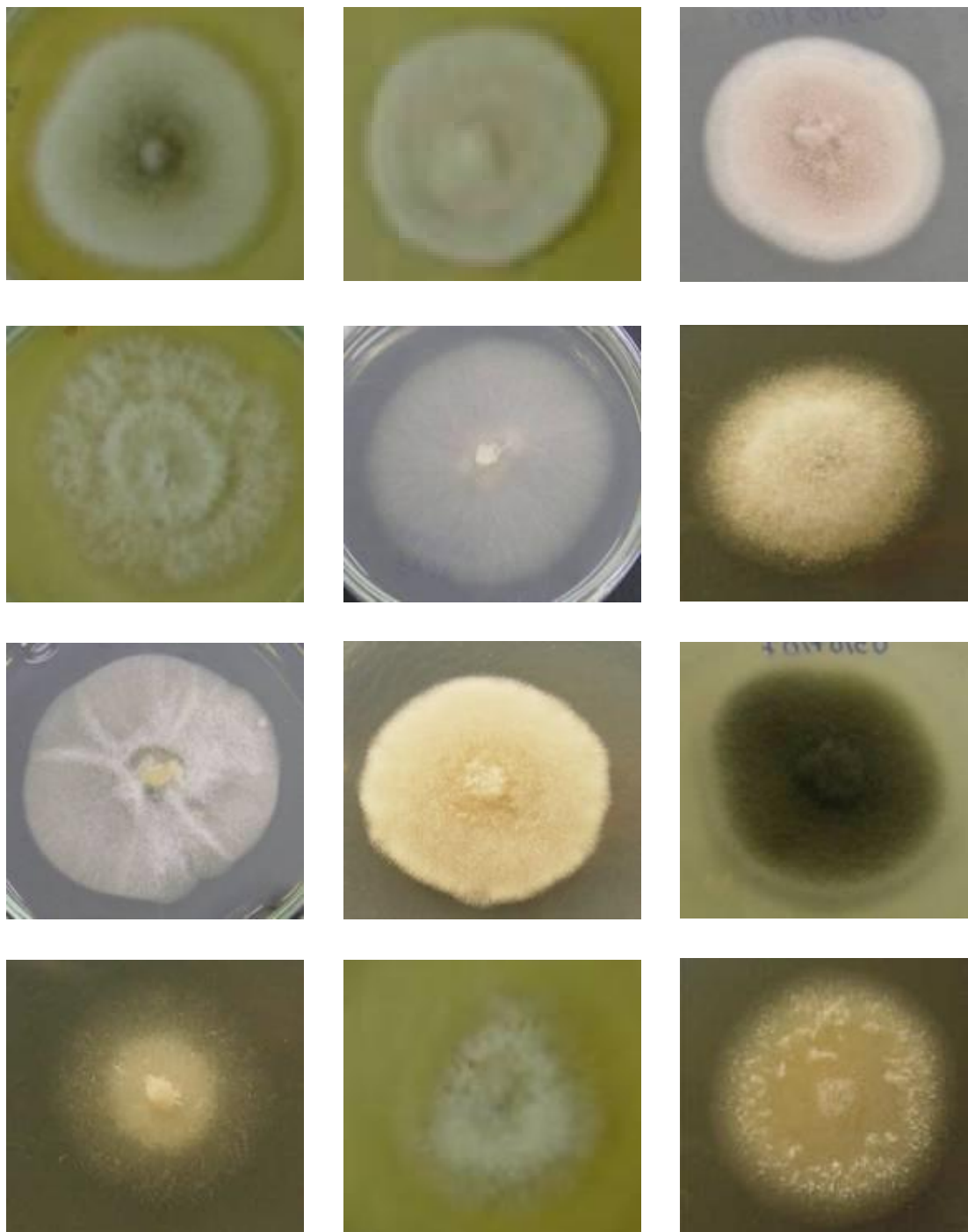


Figura 17: Fotografias de colônias de fungos endofíticos isolados de *Hevea brasiliensis*, purificados em meio BDA e mantidos em B.O.D. a 28°C por um período de 7 a 10 dias.

4.2 ANTAGONISMO *IN VITRO*

4.2.1 Obtenção do extrato bruto

Devido ao grande número de fungos isoladas neste trabalho, não foi possível a realização dos ensaios de antagonismo com todos os fungos. Para a obtenção dos extratos brutos a serem utilizados nos ensaios de antagonismo, foram selecionados ao acaso 88 isolados de fungos endofíticos que correspondem ao somatório de 20% do total recuperado de cada variedade de *H. brasiliensis*, sendo 40 fungos isolados da variedade FX3864, 28 endófitos da variedade CDC312 e 20 isolados da variedade MDF180 (Tabela 3).

Tabela 3. Fungos endofíticos selecionados para os ensaios de antagonismo contra o fitopatógeno *M. ulei*, distribuídos de acordo com a variedade de *H. brasiliensis* em que foram recuperados

FUNGOS ENDOFÍTICOS		
<i>H. brasiliensis</i> FX3864	<i>H. brasiliensis</i> CDC312	<i>H. brasiliensis</i> MDF180
PMBFX002	PMBCDC004	PMBMDF001
PMBFX003	PMBCDC007	PMBMDF012
PMBFX013	PMBCDC014	PMBMDF015
PMBFX025	PMBCDC026	PMBMDF021
PMBFX028	PMBCDC029	PMBMDF028
PMBFX032	PMBCDC034	PMBMDF031
PMBFX035	PMBCDC035	PMBMDF036
PMBFX038	PMBCDC043	PMBMDF038
PMBFX041	PMBCDC047	PMBMDF040
PMBFX045	PMBCDC050	PMBMDF048
PMBFX052	PMBCDC061	PMBMDF049
PMBFX055	PMBCDC063	PMBMDF054
PMBFX056	PMBCDC068	PMBMDF071
PMBFX063	PMBCDC070	PMBMDF077
PMBFX064	PMBCDC073	PMBMDF078
PMBFX077	PMBCDC074	PMBMDF083
PMBFX078	PMBCDC085	PMBMDF087
PMBFX081	PMBCDC086	PMBMDF089
PMBFX082	PMBCDC097	PMBMDF091
PMBFX090	PMBCDC104	PMBMDF092
PMBFX092	PMBCDC115	
PMBFX109	PMBCDC116	
PMBFX116	PMBCDC118	
PMBFX125	PMBCDC123	
PMBFX127	PMBCDC124	
PMBFX136	PMBCDC130	
PMBFX144	PMBCDC136	
PMBFX146	PMBCDC139	
PMBFX147		
PMBFX152		
PMBFX155		
PMBFX156		
PMBFX158		
PMBFX167		
PMBFX175		
PMBFX178		
PMBFX182		
PMBFX187		
PMBFX189		
PMBFX197		

A partir desses espécimes selecionados foram obtidos extratos brutos após crescimento em meio de cultura líquido extrato de malte (EM) e um extrato contendo apenas o meio de cultura estéril como controle negativo. Durante o período de incubação (10 dias), as culturas líquidas foram visualmente monitoradas quanto à contaminação por outros microrganismos diariamente. A fermentação em meio líquido tem sido utilizada como a principal ferramenta para a produção de metabólitos secundários no ramo industrial. Segundo Robinson et al. (2001), esse processo permite um maior controle das condições de cultivo, como pH, temperatura e concentração de nutrientes.

Após o período de incubação, aproximadamente 10% dos extratos obtidos apresentaram visível mudança da coloração do meio líquido, provavelmente ocasionado por alteração de propriedades químicas do meio devido à produção de composto(s) secretado(s) pelo fungo em crescimento neste meio.

4.2.2 Produção dos conídios

O aparecimento das primeiras lesões das plantas foi observado a partir do sexto dia após a infecção com conídios das duas variedades fisiológicas de *M. ulei* PMB26 e *M. ulei* PMB28. A produção de conídios nessas lesões iniciou-se cerca de oito dias após a infecção e, a partir deste ponto, houve um aumento do número de lesões nas lâminas foliares infectadas e, conseqüentemente, maior produção de esporos assexuados.

A obtenção de uma grande quantidade de conídios de *M. ulei* em um curto período de tempo decorre da utilização da variedade de *H. brasiliensis* PB314 que apresenta alta suscetibilidade à infecção por este fitopatógeno, podendo provocar os níveis mais elevados de sintomas característicos da doença “mal-das-folhas” nas plantas infectadas em intervalos de tempo relativamente pequenos se comparada a outras variedades de *H. brasiliensis*. A variedade fisiológica de *M. ulei* PMB28 apresentou uma maior esporulação em relação à variedade PMB26, o que corrobora com estudos realizados em câmara úmida, conduzidos pelo pesquisador Carlos Mattos, Diretor Científico do Departamento de Pesquisa da PMB (dados não publicados). Com o objetivo de conhecer melhor a diversidade do *M. ulei*, este pesquisador, juntamente com colaboradores, avaliaram a ação de diversas raças de *M. ulei* em plantas de seringueira suscetíveis utilizando-se uma escala de notas de 1 a 6, que mede a virulência e a

intensidade de esporulação do fitopatógeno na planta, conseguindo identificar 36 padrões de virulência entre 50 isolados testados e diversos níveis de agressividade destas raças sobre os clones de seringueira testados (MATTOS, 2003).

4.2.3 Influência do Extrato de Malte sobre a germinação dos conídios de *M. ulei* PMB26 e *M. ulei* PMB28

As análises de variância para os testes de germinação de conídios de *M. ulei* em presença de diferentes concentrações de extrato de malte são apresentadas na Tabela 4. Através do teste de ANOVA, verificou-se que há diferenças significativas entre as médias de germinação das diferentes concentrações de extrato de malte testadas. Observou-se uma elevada homogeneidade entre as médias de germinação das quatro repetições na placa. Quanto à repetição do inóculo não foram verificadas médias de germinação significativamente diferentes entre os dois ensaios realizados. Os resultados dos testes de germinação demonstraram não haver diferenças significativas entre as médias percentuais de germinação das duas variedades de *M. ulei* (PMB26 e PMB28) (Figura 18). Após os testes de ANOVA, as médias de germinação das diferentes concentrações foram submetidas ao teste de Duncan. Com isso, verificou-se que as concentrações de extrato de malte 12,5%, 25%, 37,5% e 50% não diferem significativamente do controle (0% de EM). Entretanto, há um efeito significativo das concentrações 62,5% e 75% sobre a germinação dos conídios em relação ao controle (0% de EM) e entre si (Tabela 5). É possível que estas concentrações mais altas possam desencadear um desequilíbrio osmótico em algumas células conidiais, inibindo o desenvolvimento do tubo germinativo. Entretanto, são necessários estudos específicos para averiguar este fato.

Tabela 4. Resultados de análises de variância (ANOVA) para o teste da concentração do meio de cultura liofilizado sobre a germinação de dois isolados de *M. ulei* (PMB26 e PMB28)

Efeitos testados	DF	Quadrado médio	Valor F	Pr>F
Concentração meio de cultura	6	354,78	10,04	<0,0001
Intra isolado <i>M. ulei</i> (repetição do inoculo)	1	1,28	0,04	0,8494
Repetição na placa (associado ao isolado e a concentração)	48	6,4	0,18	1,0000

Tabela 5. Determinação das médias de germinação dos conídios de *M. ulei* (PMB26 e PMB28) em diferentes concentrações do meio de cultura extrato de malte

Concentração do meio de cultura (%)	Numero de observações	Media % Germinação ⁽¹⁾
0	16	78 ^a
25	16	76 ^a
12,5	16	76 ^a
50	16	75 ^a
37,5	16	75 ^a
62,5	16	70 ^b
75	16	64 ^c

(1) Médias seguidas da mesma letra denotam a não-diferença estatística pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

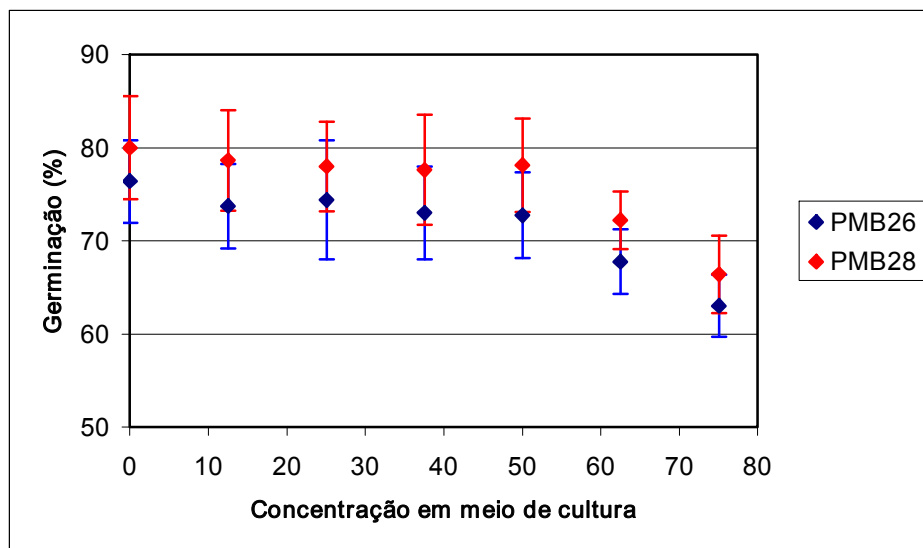


Figura 18. Efeito do Extrato de Malte na germinação de conídios das variedades fisiológicas de *M. ulei* PMB26 e PMB28. Cada ponto representa as médias de germinação dos conídios, seguida pelo erro padrão.

A partir desses resultados, determinou-se a concentração de 50% de extrato bruto a ser inicialmente utilizada nos testes de germinação, por esta ser a maior concentração dentre aquelas que não diferiram significativamente do controle em ambas as variedades de *M. ulei*. Optou-se inicialmente pela utilização da concentração mais alta de meio de cultura que não apresentou efeito significativo sobre a germinação dos conídios devido a maior disponibilidade de nutrientes nesta concentração para a germinação dos conídios, o que possivelmente aumentaria a probabilidade de selecionar os extratos com inibição efetiva contra o *M. ulei*.

4.2.4 Teste de germinação dos conídios de *M. ulei* PMB26 e de *M. ulei* PMB28 produzidos em *H. brasiliensis* PB314 na presença do extrato bruto do meio de cultivo dos fungos endofíticos

Do total de 88 fungos endofíticos submetidos aos ensaios de antagonismo através de extratos brutos concentrados a 50% (Figura 19 e 20), 46 (52,3%) apresentaram efeito significativo sobre a germinação dos conídios das duas variedades fisiológicas de *M. ulei* (PMB26 e PMB28), pelo teste “t” de Student, a 5% de probabilidade (Tabela 6). Os outros extratos que não tiveram efeito significativo apresentaram médias percentuais de inibição entre -10% e 10% (dados não mostrados). Em todos os extratos testados, não há diferenças significativas entre os resultados de germinação das duas variedades de *M. ulei*, sendo suas médias percentuais de inibição bastante correlacionadas (Figura 21). Este fato demonstra a homogeneidade do potencial bioativo destes isolados sobre a germinação dos conídios testados.

Os extratos dos 46 isolados ativos foram reunidos em três grupos, conforme as médias percentuais de inibição obtidas (Tabela 7): A - extratos que apresentaram porcentagens de inibição negativas, ou seja, que proporcionaram o aumento do número de conídios germinados em relação ao controle. Pertencem a este grupo quatro isolados, dentre os quais 50% foram recuperados da linhagem CDC 312; B - extratos com médias percentuais de inibição entre 0% a 43,0% e C - extratos com médias percentuais de inibição acima de 80%. Não foram observadas médias percentuais de inibição entre 44% e 79%.

Do total dos fungos testados, 38,6% apresentaram médias percentuais de inibição da germinação de conídios acima de 80%. Obviamente, esse resultado foi claramente perceptível *in vitro* ao se comparar com o controle, verificando-se ainda que estes valores de inibição se mantiveram nas duas variedades de *M. ulei* testadas. Observou-se ainda que do total dos 20 fungos isolados da linhagem MDF180 e submetidos aos ensaios de antagonismo, 65,0% apresentou inibição acima de 80% (Tabela 6) sobre a germinação dos conídios das duas variedades de *M. ulei* (PMB26 e PMB28). Este valor difere consideravelmente do número de fungos que apresentaram inibição acima de 80%, isolados das linhagens FX3864 (30%) e CDC312 (32%). Este fato pode estar associado a uma certa especificidade entre os fungos antagonísticos e a planta hospedeira pertencente à linhagem MDF180, indicando que estes

microrganismos podem estar correlacionados com a resistência ao mal das folhas, uma vez que mecanismos inerentes a esta linhagem impedem o avanço do ciclo do *M. ulei* para a fase sexuada, retardando a formação de estromas (LE GUEN et al, dados não publicados). Estes mecanismos podem estar relacionados à ação de compostos sintetizados pelos fungos endofíticos que atuam diretamente na germinação dos conídios em determinado momento do ciclo do fitopatógeno impedindo a reinfecção da planta e conseqüente continuidade no desenvolvimento dos sintomas da doença.

A existência de fungos endofíticos com atividade biológica corrobora com vários outros estudos semelhantes encontrados na literatura, mostrando a importância destes fungos como fontes de moléculas bioativas (VOLKSCH et al., 1992; BROOKS et al., 1994; LIMA et al., 1994; CHRISTENSEN, 1996; PAN et al., 1997; ARAÚJO et al., 2001; LIMA et al., 2002; ARAÚJO et al., 2002). Bastos (1978) avaliou inúmeros isolados fúngicos quanto ao seu potencial antagônico a *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da vassoura de bruxa no cacau, e verificou uma frequência acima de 16% de fungos endofíticos com potencial antagônico a este fitopatógeno. Peláez et al. (1998) observaram um efeito inibitório de 27% de fungos endofíticos testados contra ao menos um microrganismos alvos. Souza et al. (2004), após testar 79 extratos obtidos de fungos endofíticos das plantas tóxicas da Amazônia *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* verificaram atividade antimicrobiana em 24% do total de extratos testados contra microrganismos patogênicos e fitopatogênicos. Wang et al. (2006) obtiveram atividade antimicrobiana de 53,7% de um total de 67 fungos endofíticos testados, isolados de *Quercus variabilis*, na China. Sette et al. (2006) isolaram fungos endofíticos de espécies de café, *Coffea arabica* e *C. robusta*, e após serem submetidos a ensaios de antagonismo *in vitro* observaram que 53,5% destes fungos apresentavam atividade antimicrobiana. Teixeira (2007) obteve atividade antimicrobiana de 27,2% do total de 121 fungos testados isolados de plantas presentes em fragmentos florestais naturais, “ipucas”, no Cerrado do Estado do Tocantins, contra um ou mais microrganismos alvos de interesse médico e econômico.

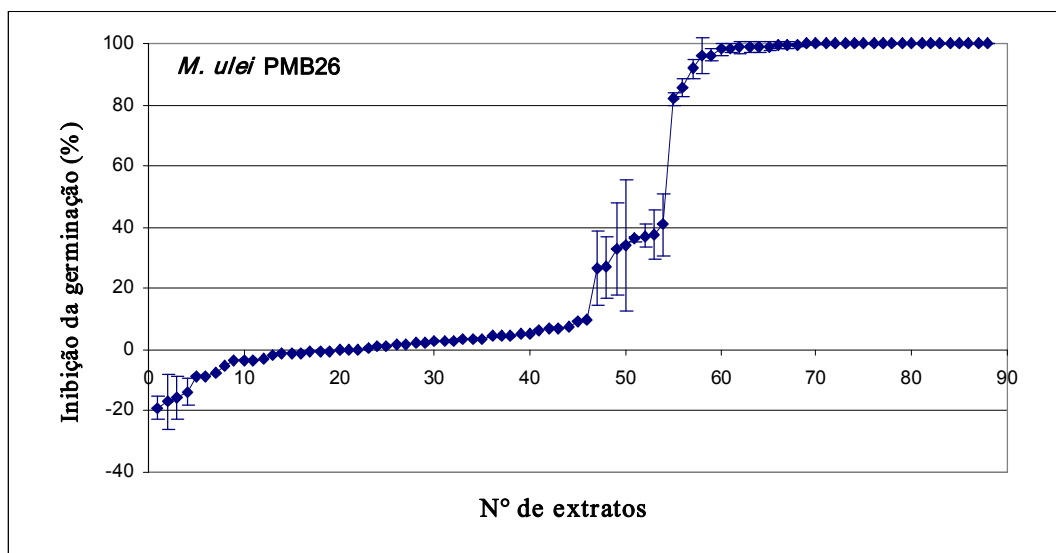


Figura 19: Curva de inibição dos resultados dos 88 testes de germinação de esporos de *M. ulei* PMB26 em presença de extratos brutos na concentração de 50%.

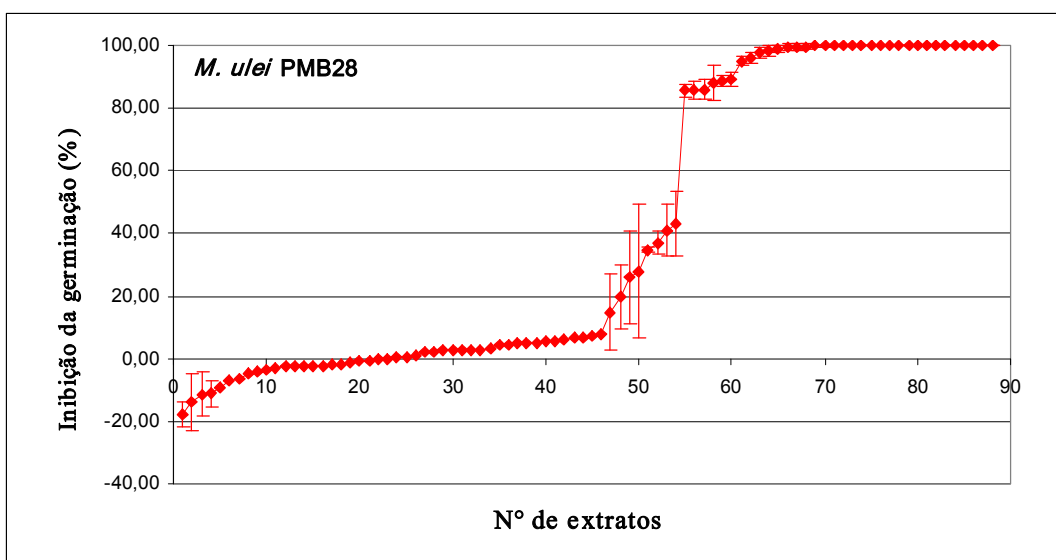


Figura 20: Curva de inibição dos resultados dos 88 testes de germinação de esporos de *M. ulei* PMB28 em presença de extratos brutos na concentração de 50%.

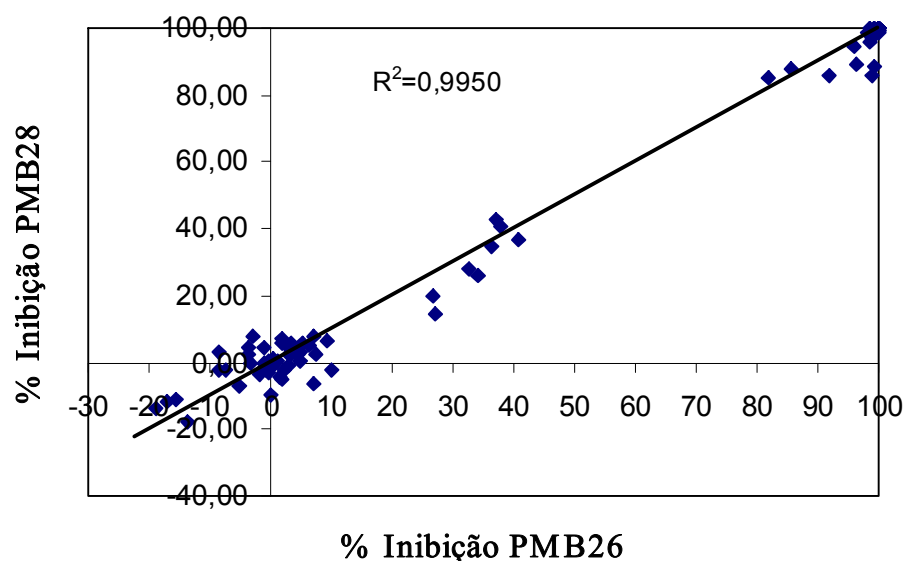


Figura 21. Correlação entre as percentagens de inibição dos 88 extratos brutos concentrados em 50% que apresentaram efeito significativo sobre a germinação dos conídios das variedades fisiológicas de *M. ulei* PMB26 e PMB28.

Tabela 6. Distribuição do número de isolados de fungos endofíticos nos ensaios de antagonismo (extratos brutos de 50%) contra *M. ulei*, de acordo com o efeito sobre a germinação dos conídios e a linhagem de *H. brasiliensis*

Linhagem de <i>H. brasiliensis</i>	Nº de fungos endofíticos testados	Sem efeito significativo sobre a germinação	Com efeito significativo sobre a germinação ⁽¹⁾			
			Efeito positivo	Efeito negativo		Total
				Inibição 10-50%	Inibição >80%	
FX3864	40	23	1	5	12	17
CDC312	28	14	2	3	9	14
MDF180	20	5	1	1	13	15
Total	88	42	4	8	34	46

(1) Nº de isolados na germinação de conídios tanto sobre as variedades PMB26 quanto sobre a variedade PMB28.

Tabela 7. Médias percentuais de inibição dos fungos endofíticos que apresentaram influência significativa (teste de “t” de student, $p < 0,05$) sobre a germinação dos conídios das duas variedades fisiológicas de *M. ulei* (PMB26 e PMB28), na presença de extratos concentrados em 50%

GRUPO	ISOLADO	VARIEDADE DE ORIGEM	MÉDIA % DE INIBIÇÃO ⁽¹⁾	
			<i>M. ulei</i> PMB26	<i>M. ulei</i> PMB28
A	PMBFX155	FX3864	-13,7±4,1a	-17,8±5,7a
A	PMBCDC050	CDC312	-17,0±9,1a	-11,5±2,1a
A	PMBCDC116	CDC312	-15,7±7,1a	-11,2±5,1a
A	PMBMDF040	MDF180	-18,9±3,8a	-13,9±5,5a
B	PMBFX081	FX3864	36,2±0,9b	34,8±10,5b
B	PMBFX146	FX3864	26,5±12,2b	20,0±12,4b
B	PMBFX187	FX3864	32,7±15,0b	27,9±8,8b
B	PMBFX189	FX3864	37,1±3,8b	43,0±6,3b
B	PMBCDC043	CDC312	27,0±10,2b	14,8±7,3b
B	PMBCDC047	CDC312	40,8±10,3b	37,1±10,2b
B	PMBCDC136	CDC312	34,2±21,3b	26,0±12,1b
B	PMBMDF078	MDF180	37,6±8,2b	40,9±10,7b
C	PMBFX028	FX3864	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBFX032	FX3864	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBFX045	FX3864	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBFX052	FX3864	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBFX055	FX3864	100,0±0,0c	94,9±5,5c
C	PMBFX056	FX3864	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBFX063	FX3864	81,9±1,8c	85,5±5,3c
C	PMBFX090	FX3864	100,0±0,0c	99,4±0,9c
C	PMBFX092	FX3864	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBFX116	FX3864	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBFX127	FX3864	100,0±0,0c	99,6±0,6c
C	PMBFX147	FX3864	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBCDC004	CDC312	98,8±1,7c	85,8±5,1c
C	PMBCDC014	CDC312	99,5±0,7c	99,6±0,9c
C	PMBCDC026	CDC312	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBCDC034	CDC312	99,3±1,0c	100,0±0,0c
C	PMBCDC061	CDC312	99,8±0,2c	100,0±0,0c
C	PMBCDC085	CDC312	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBCDC086	CDC312	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBCDC104	CDC312	98,6±1,9c	100,0±0,0c
C	PMBCDC124	CDC312	98,8±1,8c	97,6±3,4c
C	PMBMDF001	MDF180	91,7±3,1c	85,9±5,9c
C	PMBMDF012	MDF180	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBMDF031	MDF180	100,0±0,0c	98,4±2,2c
C	PMBMDF036	MDF180	85,5±2,9c	88,0±4,2c
C	PMBMDF038	MDF180	99,8±0,2c	99,9±0,2c
C	PMBMDF049	MDF180	98,2±2,1c	98,8±1,7c
C	PMBMDF054	MDF180	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBMDF071	MDF180	99,2±1,2c	88,7±6,4c
C	PMBMDF077	MDF180	99,1±1,2c	100,0±0,0c
C	PMBMDF087	MDF180	100,0±0,0c	99,7±0,4c
C	PMBMDF089	MDF180	96,2±1,9c	89,3±5,4c
C	PMBMDF091	MDF180	100,0±0,0c	100,0±0,0c
C	PMBMDF092	MDF180	98,5±1,4c	96,0±5,6c

(1) Os valores apresentados correspondem às médias ± erros-padrão do percentual de inibição dos extratos de fungos endofíticos de dois ensaios independentes em quadruplicata. Médias seguidas de letras distintas são significativamente diferentes (teste de Tukey a 5% de probabilidade) entre isolados de fungos endofíticos, e entre as duas variedades de *M. ulei* (PMB26 e PMB28).

Os extratos brutos dos fungos que apresentaram as maiores médias percentuais de inibição (>80%) foram utilizados em testes de germinação em concentração de 12,5%, a fim de se avaliar a manutenção da atividade inibitória sobre os conídios de *M. ulmi* em menor concentração dos extratos brutos. A partir dos resultados obtidos pôde-se observar que, nesta concentração, também não houve diferenças significativas entre os resultados das duas variedades de *M. ulmi* (PMB26 e PMB28) (Figura 22). Verificou-se que dos 34 extratos testados, 70,5% inibiram significativamente a germinação dos conídios das duas variedades ensaiadas, pelo teste “t” de student, apresentando médias percentuais de inibição maior que 10% (Tabela 8). Dentre estes isolados, 15 mantiveram o efeito inibitório acima de 80% sobre a germinação dos conídios (PMB26 e PMB28) (Tabela 9), revelando que os metabólitos presentes nestes extratos possuem um grande potencial antifúngico, mesmo em concentrações mais baixas. A diminuição do número de extratos brutos que apresentaram inibição significativa acima de 80%, em concentrações de 12,5% pode ainda estar relacionada à menor disponibilidade de metabólitos bioativos presentes na solução.

Dos 88 extratos testados na concentração de 50%, 14 apresentaram atividade inibitória de 100% contra a germinação de conídios de *M. ulmi*. Destes extratos, após ensaios na concentração de 12,5%, sete mantiveram o efeito inibitório de 100% (Tabelas 7 e 9).

Nos testes de germinação, realizados com os extratos brutos nas concentrações de 50% e 12,5%, não há evidências de que os componentes do meio de cultura tenham inibido a germinação dos conídios, uma vez que este meio foi previamente testado nessas concentrações, não havendo influência significativa sobre a germinação (Tabela 5).

Em todos os ensaios de antagonismo cujos resultados apresentaram inibição significativa, observou-se, além da diminuição do número de conídios germinados (Figura 23), a redução do tamanho do tubo germinativo dos esporos remanescentes (Figura 24). Esses esporos podem estar fisiologicamente comprometidos, não sendo viáveis para a formação de apressórios e a penetração no tecido vegetal do hospedeiro. Este aspecto poderia ser analisado em trabalhos futuros visando verificar a formação de apressório e a penetração desses conídios no tecido vegetal do hospedeiro.

É conveniente ressaltar que os testes de germinação de conídios de *M. ulmi* na presença de extratos obtidos de fungos endofíticos, realizados em laboratório, sob condições controladas, foram importantes em indicar a capacidade potencial de

metabólitos presentes nestes extratos, constituindo um passo inicial para futuros estudos.

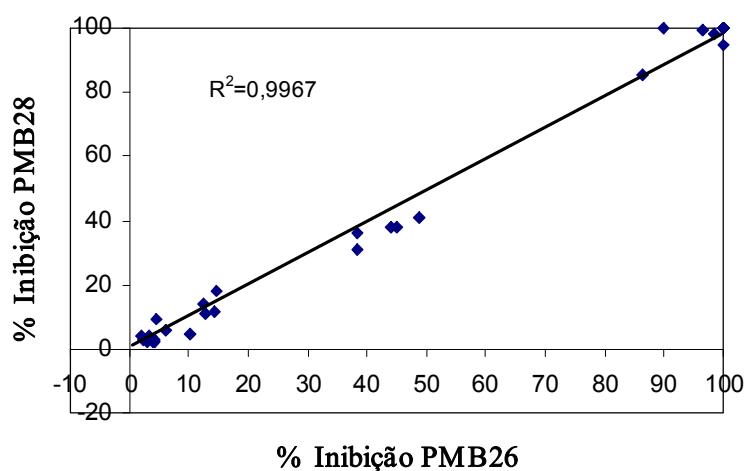


Figura 22. Correlação entre as percentagens de inibição dos 34 extratos brutos sobre a germinação dos conídios das variedades fisiológicas de *M. ulei* PMB26 e PMB28 na concentração de 12,5% do extrato bruto do meio de crescimento dos endofíticos.

Tabela 8. Distribuição do número de fungos endofíticos submetidos aos ensaios de antagonismo contra as duas variedades fisiológicas de *M. ulei* (PMB26 e PMB28) com extratos brutos a 12,5%, conforme o efeito inibitório apresentado e a linhagem de *H. brasiliensis* em que foram recuperados

Linhagem de <i>H. brasiliensis</i>	Nº de fungos endofíticos testados	Sem efeito significativo sobre a germinação	Com efeito inibitório sobre a germinação ⁽¹⁾		
			Efeito negativo		Total
			Inibição 10-50%	Inibição >80%	
FX3864	12	3	4	5	9
CDC312	9	3	3	3	6
MDF180	13	4	2	7	9
Total	34	10	9	15	24

(1) N° de isolados na germinação de conídios tanto sobre as variedades PMB26 quanto sobre a variedade PMB28.

Tabela 9. Médias percentuais de inibição dos fungos endofíticos que apresentaram influência significativa (teste de “t” de student, $p < 0,05$) com inibição acima de 80% sobre a germinação dos conídios das duas variedades fisiológicas de *M. ulei* (PMB26 e PMB28), na presença de extratos concentrados em 12,5%

ISOLADO	VARIEDADE DE ORIGEM	MÉDIA % DE INIBIÇÃO	
		<i>M. ulei</i> PMB26	<i>M. ulei</i> PMB28
PMBFX028	FX3864	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
PMBFX045	FX3864	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
PMBFX056	FX3864	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
PMBFX092	FX3864	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
PMBFX127	FX3864	86,5 \pm 1,5	85,6 \pm 3,1
PMBCDC014	CDC312	98,3 \pm 2,43	98,0 \pm 2,9
PMBCDC026	CDC312	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
PMBCDC086	CDC312	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
PMBMDF012	MDF180	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
PMBMDF036	MDF180	96,6 \pm 3,5	99,3 \pm 1,0
PMBMDF049	MDF180	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
PMBMDF077	MDF180	100,0 \pm 0,0	95,4 \pm 3,0
PMBMDF087	MDF180	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
PMBMDF089	MDF180	89,9 \pm 3,6	100,0 \pm 0,0
PMBMDF092	MDF180	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0

(1) Os valores apresentados correspondem às médias \pm erros-padrão do percentual de inibição dos extratos de fungos endofíticos de dois ensaios independentes em quadruplicata.

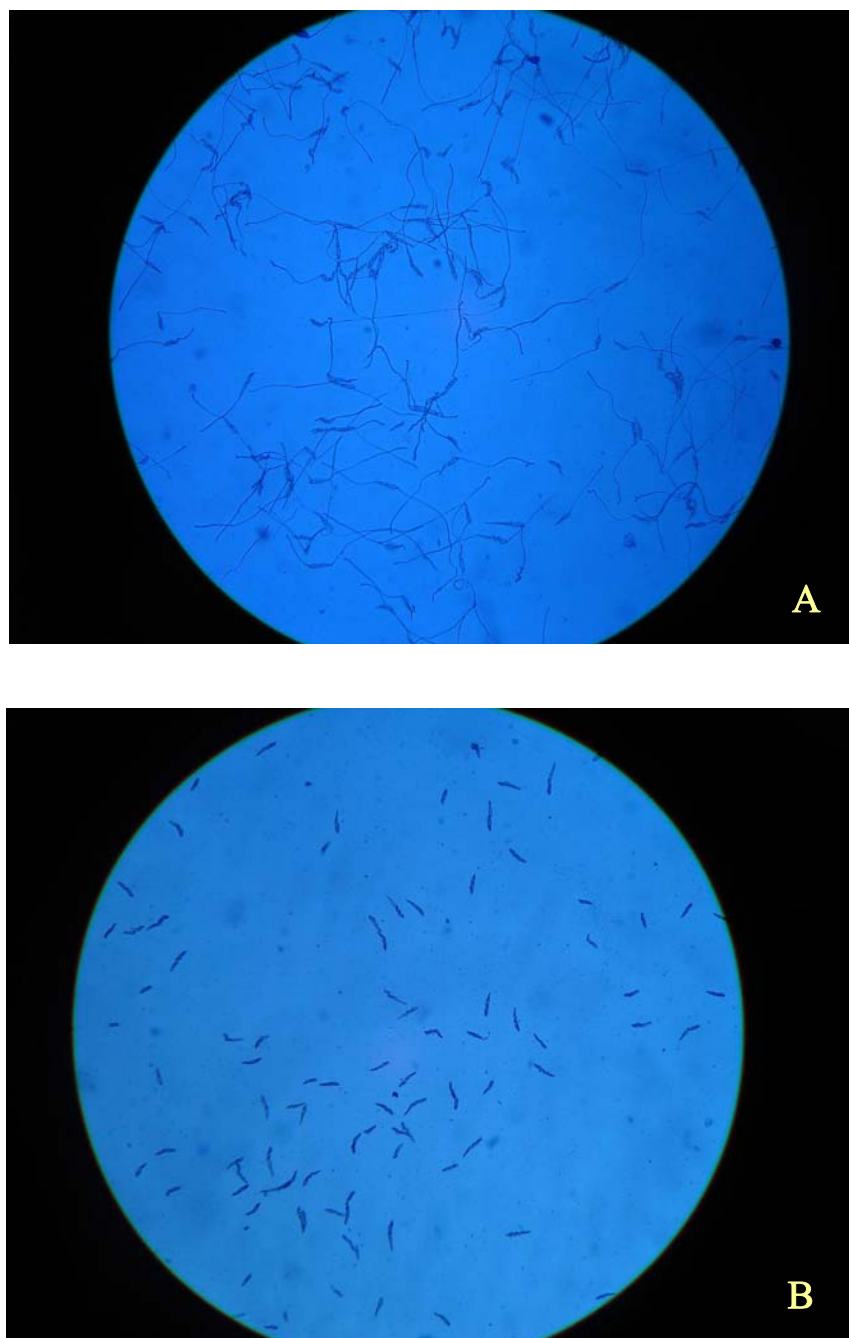


Figura 23. Campos sob visualização em microscópio óptico na objetiva de 10X, selecionados para a contagem de conídios de *M. ulei* PMB26, os quais foram mantidos por 12 horas em B.O.D. a 24°C sobre placas de Petri contendo o ágar a 1,5%. A – Campo 2 da placa-controle referente, apresentando 96% de conídios germinados. B – Campo 4 da placa-teste PMBFX56 na presença de extrato bruto de concentração 50%, apresentando 0% de conídios germinados

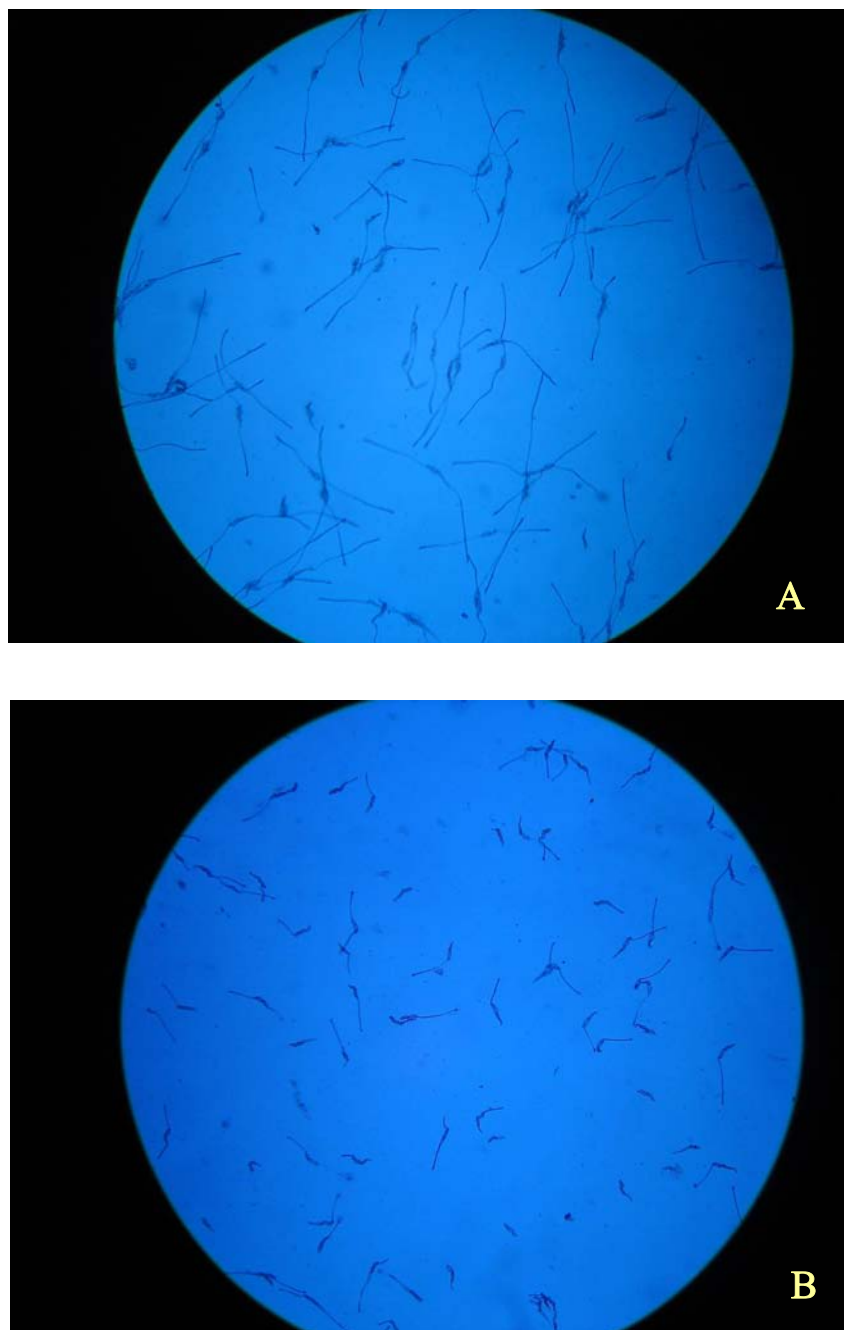


Figura 24. Campos sob visualização em microscópio óptico na objetiva de 10X, selecionados para a contagem de conídios de *M. ulei* PMB28, os quais foram mantidos por 12 horas em B.O.D. a 24°C sobre placas de Petri contendo o ágar a 1,5%. A – Campo 1 da placa-controle apresentando 96% de conídios germinados. B – Campo 1 da placa-teste PMBCDC85 na presença de extrato bruto em concentração de 50%, apresentando 75% de conídios germinados. Observa-se neste campo uma considerável diminuição do tamanho do tubo germinativa desses conídios em relação àqueles germinados na placa-controle, visualizados no item A.

4.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA O *Microcyclops ulei*

Dentre os 15 isolados que produziram as maiores médias percentuais de inibição (>80%) sobre a germinação de conídios de *Microcyclops ulei* com extratos 50% e 12,5%, onze (11) foram identificados até o presente momento. Problemas com a amplificação dos outros quatro isolados inviabilizaram a identificação dos mesmos.

A maioria dos isolados identificados foram classificados ao nível de gênero, utilizando-se os resultados do seqüenciamento das regiões dos espaçadores internos transcritos (ITS 1 e 2) e a porção inicial do gene nuclear que codifica o RNA ribossômico (rDNA) nuclear da subunidade maior (28S). O seqüenciamento dessas regiões vem sendo utilizado para a caracterização da diversidade de organismos endofíticos de várias plantas como *Solanum tuberosum* (batata), *Oryza sativa* (arroz), *Triticum aestivum* (trigo), *Zea mays* (milho) (GERMIDA et al., 1998; IDRIS et al., 2004; VERMA, 2001). A identificação de microrganismos diretamente através de métodos moleculares vem se tornando bastante freqüente, principalmente após o avanço de técnicas moleculares a partir da década de 80 do século passado. Atualmente, a utilização destes métodos constitui a principal abordagem para a identificação de microrganismos (PILEGGI, 2006).

As seqüências obtidas foram comparadas com os dados do GenBank pelo programa BLASTn, disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov). A pesquisa no BLASTn fornece uma lista de organismos cujas seqüências mais se assemelham àquela seqüência confrontada, fornecendo, entre diversas informações, a porcentagem de bases semelhantes entre os dois organismos (cobertura) e o quão confiável é a correlação entre o isolado confrontado e aquele semelhante (identidade), depositado no banco de dados (ALTSCHUL et al., 1997). Os dados dos gêneros ou espécies obtidas são exibidos na Tabela 10. Observa-se que, com exceção da seqüência do rDNA 28S do isolado PMBMDF036, os resultados da análise comparativa por similaridade variaram de 96% a 100% de identidade de bases das seqüências pesquisadas, e podem ser considerados como confiáveis, conforme ALTSCHUL et al. (1997).

As duas seqüências (ITS e rDNA 28S) foram, em geral, concordantes, exceto para os isolados PMBCDC026, PMBMDF036 E PMBMDF049, em que, após análise no BLASTn, resultaram em gêneros diferentes (Tabela 9). Contudo, foi possível uma

identificação conclusiva destes três isolados ao se analisar as porcentagens de cobertura e identidade das seqüências ITS e rDNA 28S de cada um, assim como o número de bases analisadas de cada seqüência em relação ao total de bases comumente esperado para estas regiões, em caso de fungos filamentosos (600 pb para ITS e 900 pb para o rDNA 28S) (NCBI, 2007).

Os gêneros ou espécies identificadas foram: *Fusarium* sp., *Glomerella cingulata*, *Phomopsis* sp., *Microdiplodia* sp., *Myrothecium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. (Tabela 9) Estes fungos são comumente descritos como fitopatogênicos. Por outro lado, isolados pertencentes a estes grupos têm figurado entre os endófitos mais comuns de uma ampla gama de plantas hospedeiras (CANNON; SIMMONS, 2002; FREIRE; BEZERRA, 2001; GUO et al., 2000, 2001; HATA et al., 2002; LODGE et al., 1996; PHOTITA et al., 2001; RODRIGUES; SAMUELS, 1999; SURYANARAYANAN et al., 2002). Rubini et al. (2005) isolaram de *Theobroma cacao* (cacau), praticamente todos os gêneros identificados no presente trabalho, com exceção de *Glomerella*. Arnold et al. (2003), analisando endofíticos de *Theobroma cacao* (cacau), encontraram um grande número de isolados pertencentes aos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*. Azevedo e Petrini (2003), por sua vez, isolaram espécies de fungos endofíticos de folhas de *Stylosanthes guianensis*, sendo os gêneros *Phomopsis* e *Glomerella* os mais abundantes. Tejesvi et al. (2006) isolaram espécies de *Fusarium*, *Pestalotiopsis* e *Myrothecium* de plantas medicinais de diferentes regiões do sudeste da Índia, representando 61% do total de fungos endofíticos obtidos. Recentemente, Naik et al. (2007) em um estudo da diversidade da comunidade endofítica de *Oryza sativa* (arroz) observou a predominância de espécies de *Fusarium* entre os fungos endofíticos isolados. Não há registros na literatura em relação à atividade antifúngica destes fungos sobre o *M. ulei*.

Tabela 10: Relação dos fungos endofíticos identificados, que apresentaram efeito inibitório acima de 80% sobre a germinação dos conídios de M.ulei PMB26 e PMB28 nas concentrações de extrato bruto 50% e 12,5%

ISOLADO	REGIÃO ITS				REGIÃO rDNA 28S ⁽¹⁾				CONSENSO
	Número de acesso "Genbank"	Nº bases analisadas / Cobertura	Identidade	Identificação do isolado	Número de acesso "Genbank"	Nº bases analisadas / Cobertura	Identidade	Identificação do isolado	
PMBFX028	DQ098909.1	297; 100%	98%	<i>Fusarium</i> sp.	—	—	—	—	<i>Fusarium</i> sp.
PMBFX056	EU008856.1	360; 100%	98%	<i>Glomerella cingulata</i>	DQ286225.2	815; 100%	100%	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Glomerella cingulata</i>
PMBFX092	AM262356.1	310; 99%	96%	<i>Phomopsis</i> sp.	DQ377926.1	781; 100%	99%	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.
PMBFX127	EF488817.1	565; 99%	96%	<i>Glomerella cingulata</i>	DQ286181.1	865; 99%	99%	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Glomerella cingulata</i>
PMBCDC014	DQ135992.1	505; 99%	98%	<i>Myrothecium</i> sp.	AY489708.1	615; 100%	98%	<i>Myrothecium</i> sp.	<i>Myrothecium</i> sp.
PMBCDC026	DQ135992.1	165; 100%	96%	<i>Myrothecium</i> sp.	AF439629.1	760; 100%	99%	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp. ⁽²⁾
PMBMDF036	AB219013.1	576; 99%	99%	<i>Glomerella cingulata</i>	AF439632.1	535; 98%	94%	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Glomerella cingulata</i> ⁽³⁾
PMBMDF049	EF094551.1	578; 96%	96%	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	DQ885897.1	884; 99%	98%	<i>Microdiplodia</i> sp.	<i>Microdiplodia</i> sp. ⁽⁴⁾
PMBMDF077	AF158306	520; 99%	96%	<i>Fusarium</i> sp.	EF590327.1	882; 99%	98%	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
PMBMDF087	EF451804.1	349; 98%	96%	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	AF382357.1	871; 98%	99%	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
PMBMDF089	EU030346.1	315; 100%	96%	<i>Fusarium</i> sp.	—	—	—	—	<i>Fusarium</i> sp.

(1) As células com “—” significam que não houve o sequenciamento da porção inicial do gene 28S do rDNA para o isolado correspondente.

(2) Considerou-se a identificação obtida apenas para a região rDNA 28S já que houve um maior percentual de identidade e o número de bases analisadas, em comparação com o tamanho esperado, foi consideravelmente maior do que o encontrado para a região ITS.

(3) Considerou-se a identificação obtida apenas para a região ITS já que houve um maior percentual de identidade e o número de bases analisadas, em comparação com o tamanho esperado, foi consideravelmente maior do que o encontrado para a região rDNA 28S.

(4) Considerou-se a identificação obtida apenas para a região rDNA 28S por esta apresentar um maior percentual de identidade e cobertura em comparação àqueles obtidos para a região ITS.

O gênero *Fusarium* constitui espécies de fungos amplamente distribuídos em todo o mundo, sendo habitantes do solo, patógenos de plantas e contaminantes de diversos alimentos. Este grupo é caracterizado por um rápido crescimento micelial e grandes variações das características fenotípicas, o que tem dificultado a sua identificação baseada unicamente em conceitos morfológicos (MARTINS, 2005). Muitos representantes deste gênero causam doenças em diversas culturas de interesse econômico (ApSIMON et al., 1990), tais como a Podridão-de-Fusarium em seringueira, que ocasiona a redução do crescimento da planta, podendo trazer grandes prejuízos na cultura (GASPAROTTO et al., 1997). Apesar disso, algumas espécies podem apresentar uma relação simbiótica com o hospedeiro, promovendo a sua defesa contra fungos fitopatogênicos. Tais microrganismos têm sido investigados pela sua capacidade de produção de metabólitos secundários bioativos, com grande capacidade antimicrobiana (ALROMARE et al., 2000; GUIMARÃES, 2006). Brady (2000), em estudo realizado na Costa Rica, testou a atividade antifúngica de endófitos de diversas plantas tropicais e descreveu um novo agente antimicótico, o CR377, obtido de *Fusarium* sp., demonstrando uma forte atividade deste composto contra a levedura *Candida albicans*. Lee et al. (1995) obteve subglutinóis A e B com grande atividade antifúngica sobre diversos microrganismos. Esses metabólitos foram obtidos do endófito *Fusarium subglutinans*, espécie associada à planta *Taxus wilfordii*.

A espécie *Glomerella cingulata* é comumente isolada como endófito em várias plantas tanto de ambientes tropicais como temperado, sendo relatada como dominante em folhas sadias de *Citrus* (ARAÚJO et al., 2001), *Zingiber officinale* (gengibre) (BUSSABAN et al., 2001), *Mallus comunis* (maçã) (CAMATTISARTORI et al., 2005), e *Coffea arabica* (café) (SANTAMARIA; BAYMAN, 2005), e nas plantas medicinais *Artemisia annua* (Anacardiaceae) (LU et al., 2000), *Artemisia mongólica* (Asteraceae) (ZOU et al., 2000), *Himatanthus sucuba* (Apocynaceae) (MAGALHÃES, 2001), e *Heterosmilax japonica* (GAO et al., 2005). Este fungo é também encontrado como parasita ou saprófito em tecidos de plantas vasculares. Sua forma assexuada, *Colletotrichum gloeosporioides*, é associada a enfermidades geralmente conhecidas como antracnoses, em uma grande gama de plantas de importância econômica (SREENIVASAPRASAD et al., 1996; AL-SAMARRAI et al., 2002; AGRIOS, 2004), inclusive em espécies de seringueira (“antracnose-das-folhas”), induzindo a queda das folhas em plantas jovens quando a umidade do ambiente é elevada (LOURD, 1993). Alguns trabalhos têm demonstrado processos de biotransformação de compostos e produção de metabólitos bioativos por *Glomerella cingulata* (MIYAZAWA et al., 1995,

1998; KISHORE, 2007). Kishore (2007), em um estudo da atividade antifúngica de extratos brutos de *G. cingulata*, demonstrou haver marcante atividade inibitória deste fungo contra o crescimento de *Rhizopus oryzae*, *Chrysosporium tropicum* e *Beauveria bassiana*. Um metabólito com atividade antimalárica foi extraído de espécimes endofíticas de *G. cingulata*, isoladas das plantas medicinais *Artemisia mongolica* e *Artemisia annua*, as quais produzem a artemisinina, um composto com efeito antimalárico (LU et al., 2000; ZOU et al., 2000). Este fato sugere a existência de co-produção desta substância entre o fungo e seu hospedeiro, o que pode estar relacionada à transferência horizontal de genes entre plantas e microrganismos endofíticos (STROBEL, 2002).

Fungos do gênero *Phomopsis* são ascomicetos, em fase anamórfica do gênero *Diaporthe*, freqüentemente isolados como endófitos ou associados a doenças de um grande número de plantas hospedeiras (Farr et al., 1995; Mendes et al., 1998; Rehner; Uecker, 1994; Suryanarayanan et al., 2002). A determinação da espécie dentro deste gênero é bastante complicada, devido à falta de caracteres morfológicos diferenciadores, sendo sua identificação normalmente baseada nas características de especificidade entre o fungo e sua planta hospedeira (Suryanarayanan et al., 2002). A atividade antimicrobiana de linhagens de *Phomopsis* tem sido relatada em alguns estudos. Rodrigues et al. (2000), investigando a atividade antimicrobiana de frações de extratos separados por métodos cromatográficos, obtidos de isolados fúngicos associados à planta *Spondias mombin* (Anacardiaceae) verificaram que linhagens de *Phomopsis* sp. apresentaram efeito antifúngico contra os microrganismos *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. e *Saccharomyces cerevisiae*. Uma série de compostos com efeito antibiótico foi obtida de espécimes de *Phomopsis longicolla* isolados da planta *Dicerandra frutescens* (WAGENAAR, 2001). Corrado e Rodrigues (2004) observaram que extratos de três isolados de *Phomopsis* sp. associados às plantas *Spondias mombin* e *Aspidosperma tomentosum* inibiram o crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, indicando que estes isolados representam um grande potencial em aplicações farmacêuticas e agrícolas. Schwarz et al. (2004), na Alemanha, isolaram o ácido 3-hidroxipropiônico a partir de extratos obtidos em culturas submersas de linhagens de *Phomopsis phaseoli* isoladas de folhas de plantas tropicais, e observaram que este composto apresentava atividade nematocítica contra o parasita nematóide *Meloidogyne incógnita*. Maki (2006) observou que isolados de *Phomopsis* sp. isolados de cacaueiro (*Theobroma cacao*) apresentaram atividade contra *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da vassoura de bruxa no

cacau.

O gênero *Microdiplodia*, comumente conhecido como *Diplodia*, abrange fungos saprofíticos, e patogênicos, geralmente de caráter secundário. As doenças causadas por fungos do gênero *Diplodia* são as mais freqüentes no milho, associada às espécies *D. macrospora* e *D. maydis*, trazendo grandes danos em plantações industriais (CAMARGO et al., 2005). Estes fungos produzem toxinas, impossibilitando o uso de grãos atacados como alimento (PINTO, 2006). São mais comumente isolados em regiões com temperaturas moderadas e, principalmente, ambientes úmidos (Fernandes et al., 2006; Pinto, 2006). Alguns trabalhos têm recuperado fungos pertencentes a este gênero a partir do interior de tecidos vegetais sadios (RAGAZZI et al., 1999; RAGAZZI et al., 2001; RAGAZZI et al., 2003; BURGUESS et al., 2004; STANOSZ et al., 2007). A capacidade antimicrobiana de alguns desses endofíticos também tem sido relatada. Maddau et al. (2005), após estudos da comunidade endofítica de *Quercus* sp., observou que frações de extrato obtidos da cultura líquida de *Diplodia parva* isolado desta planta, apresentavam atividade inibitória *in vitro* contra o crescimento de patógenos comuns nesta planta. Compostos terpenóides com atividade antifúngica, antibacteriana e antitumoral, obtidos de *Diplodia* spp., associado a tecidos sadios de plantas tropicais, foram relatados por Abraham (2001). Muitas espécies patogênicas deste gênero são alvos de estudos de antagonismo com fungos endofíticos bioativos, tais como *Fusarium* e *Phomopsis* (CAMARGO et al., 2005).

O gênero *Myrothecium* sp. constitui um grupo de fungos que normalmente atacam estruturas reprodutivas de uma ampla variedade de plantas de ambientes tropicais e temperados, ocasionando desde pequenas alterações fisiológicas até a morte do vegetal. A colonização natural de espécies deste grupo no interior de plantas sadias também tem sido observada (ANDOLFI et al., 2005; LIU et al., 2006; TEJESVI et al., 2006). Estes fungos produzem tricotecenos, conhecidos como verrucarinas e roridinas, que geralmente são descritos como micotoxinas causadores de enterites hemorrágicas em humanos. Entretanto, alguns destes metabólitos diterpenos são relatados como compostos bioativos em diversos testes experimentais (LI et al., 2005; XU et al., 2006), constituindo uma nova classe potencialmente importante no desenvolvimento de fármacos anticâncer e antimicrobianos (VERDI et al., 2005). Wagenaar (2001), investigando metabólitos bioativos de espécies de *Myrothecium* sp. identificou e descreveu os tricotecenos 8-acetoxiroridinea H e 8-acetoxiroridinea, os quais apresentaram efeito antimicrobiano sobre diversos fungos. Kobayashi et al. (2004) após testes *in vitro* de tricotecenos glicosídicos obtidos de frações de extratos de

Myrothecium cinctum observaram a ação antifúngica destes compostos contra fungos filamentosos de *Aspergillus* sp. e *Trichophyllum* sp., e contra as leveduras *Candida utilis* e *Candida parapsilosis*. Andolfi et al. (2005) isolaram oito metabólitos do grupo dos tricotecenos obtidos a partir da cultura líquida de linhagens de *Myrothecium* sp. isolados da planta *Orobancha ramosa*, e esses compostos apresentaram inibição significativa sobre a germinação de sementes desta planta. Liu et al. (2006), na China, após um estudo recente de caracterização do potencial antifúngico de metabólitos secundários extraídos de fungos do grupo *Myrothecium* sp. associados a *Argyrosomus argentatus*, concluíram que estes fungos constituem uma fonte eficiente de ácidos alifáticos e tricotecenos com potencial antifúngico contra as espécies patogênicas *Aspergillus niger*, *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*.

Pestalotiopsis sp. é um fungo anamorfo normalmente caracterizado como saprófita. Representa um grupo complexo de fungos, podendo ser confundido com diversos outros gêneros. Podem apresentar eventual ação fitopatogênica em plantas cultivadas em clima desfavorável. Representantes deste grupo são comumente encontrados como endófitos (STROBEL, 2002) e alguns dos quais são citados como produtores de metabólitos secundários bioativos de grande interesse médico e farmacêutico (RODRIGUES et al., 2000; LI, 2001; STROBEL, 2001; STROBEL et al., 2002; DEYRUP, 2006; PILEGGI, 2006). Rodrigues et al. (2000), em estudo de atividade antimicrobiana *in vitro* de fungos endofíticos isolados de *Spondias mombin*, verificaram que extratos provenientes de cultura em meio líquido da espécie *Pestalotiopsis guepinii* foram ativos contra *Saccharomyces cerevisiae*. Siva et al. (2004), na China, observaram que extratos de *Pestalotiopsis leucothes* e *Pestalotiopsis disseminata*, isolados da planta medicinal *Tripterygium wilfordii* apresentaram atividade imunomodulatória sobre a proliferação de células sanguíneas mononucleares que estimulam a aglutinação do sangue. Por sua vez, Kumar et al. (2005), em Taiwan, observaram um efeito imunomodulatório de três compostos denominados BS, GS e YS produzidos por *Pestalotiopsis leucothes* também isolados de *T. wilfordii*, sobre células sanguíneas humanas, concluindo que estes isolados representam uma nova fonte de compostos imunomodulatórios para o tratamento de doenças do sistema imunológico. Em 2006, Pileggi observou que extratos produzidos por isolados de *Pestalotiopsis* sp. inibiram o crescimento da bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*. Estes fungos foram isolados de folhas, pecíolos e sementes da planta medicinal espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.).

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- As variedades FX3864, CDC312 e MDF180 de *H. brasiliensis* são colonizadas por fungos endofíticos filamentosos.
- Os fungos endofíticos *Fusarium* sp., *Glomerella cingulata*, *Phomopsis* sp., *Microdiplodia* sp., *Myrothecium* sp. e *Pestalotiopsis* sp., isolados apresentaram atividade inibitória significativa *in vitro* contra a germinação de conídios de *M. ulei*.
- Do total de 88 extratos brutos obtidos de fungos endofíticos e submetidos aos ensaios de anagonismo *in vitro* na concentração de 50%, 34 apresentaram efeito inibitório acima de 80% sobre a germinação de conídios das variedades de *M. ulei* PMB26 e PMB28.
- Dos 34 extratos brutos concentrados em 50%, que apresentaram atividade inibitória acima de 80% sobre a germinação dos conídios, 15 mantiveram o efeito inibitório acima de 80% em concentrações de 12,5%.
- 14 extratos testados na concentração de 50% apresentaram atividade inibitória de 100% contra a germinação de conídios de *M. ulei*. Destes extratos, após ensaios na concentração de 12,5%, sete mantiveram o efeito inibitório de 100%.
- A variedade MDF180 foi a que apresentou uma maior porcentagem de isolados endofíticos com atividade inibitória acima de 80% sobre a germinação dos conídios.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam pela primeira vez o potencial de fungos endofíticos em produzir substâncias bioativas, com atividade antimicrobiana sobre a germinação de conídios de *M. ulei*. O presente estudo representa um passo importante na busca de potenciais agentes endofíticos que contribuam para controlar o desenvolvimento do *M. ulei*. Entretanto, os dados apresentados não estabelecem a natureza dos compostos responsáveis pela ação antifúngica, verificando-se a necessidade de caracterização química dos compostos presentes nos respectivos extratos brutos, bem como da utilização destes fungos no controle biológico de *M. ulei* na planta, em condições de campo.

Como perspectivas futuras, sugere-se: (i) o fracionamento e a caracterização química do(s) composto(s) inibidores, seguidos de testes *in vitro* e *in vivo*, inicialmente em condições controladas e posteriormente em condições de campo; (ii) as análises da atividade dos 347 fungos endofíticos restantes e a identificação dos mais ativos.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, W. R. Bioactive Sesquiterpenes Produced by Fungi are they Useful for Humans as Well. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8.n. 6, p. 583-606, 2001.
- ABREU, L. M. **Diversidade de fungos endofíticos associados à planta parasita *Phoradendron perrottettii* (D.C.) Eichler e sua hospedeira *Tapirira guianensis* Aubl.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, 2005. 96 p.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. New York: Academic Press, 2005. 922 p.
- AL-SAMARRAI, T. H; SULLIVAN; P. A., TEMPLETON, M. D.; FARLEY, P. C. Peptide inhibitors of appressorium development in *Glomerella cingulata*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 2, p.203-207, 2002.
- ALMEIDA, A. R.; SALGADO, M.; LIMA, C. S.; ABREU, L. M. de; PFENNING, L. H. Comunidade de fungos endófitos em folhas e hastes do cafeeiro (*Coffea arabica*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 4., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004. p. 25-25.
- ALTOMARE, C.; PERRONE,G.; ZONNO,M. C.; EVIDENTE, A.; PENGUE, R.; FANTI, F.;POLONELLI, L. Biological Characterization of Fusapyrone and Deoxyfusapyrone, two Bioactive Secondary Metabolites of *Fusarium semitectum*. **Journal of Natural Products**,v.63, p.1131-1135, 2000.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.;MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMIN, N. **Untersuchunhen über die Bedeutung endophytischer Pilze für die biologische Bekämpfung des wandernden Endoparasiten *Radopholus similis* (Cobb) Thorne an Bananen**. Ph.D. Thesis. Germany, Bonn Universität. 1994. 122p.
- ANDOLFI, A.; BOARI, A.; EVIDENTE, A.; VURRO, M. Metabolites inhibiting germination of *Orobanche ramosa* seeds produced by *Myrothecium verrucaria* and *Fusarium compactum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1598-1603, 2005.
- ApSIMON, J. W.; BLACKWELL, B. A.; BLAIS,L.; FIELDER, D. A.; GREENHALGH, R.; KASITU,G.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. Mycotoxins from *Fusarium* species:detection, determination and variety. **Pure and Applied Chemistry**,v.62, n.7, p.1339-1346, 1990.
- ARAÚJO,W. L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; AGUILLAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interations between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A.O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVAL, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Calq, 2002, 86p.
- ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Scienses oh the United States of America**. Washington, v.100, p.15649-15654, 2003.

ARNOLD, A. E.; HERRE, A. E. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v.95, p.388-398, 2003.

AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi and their roles mainly in tropical plants. **Seventh International Symposium on Microbial Ecology**, 1-14. 1998.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, JR. W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic, microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, 3: 40-65. 2000.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: Multifaceted Microbes**, New Delhi: Anamaya Publishers, 2006.

BACON, C. W.; HINTON, D. M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: Hurst, C. J.; Knudsen, G. R.; McInerney, M. J.; Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: American Society of Microbiology. 1997.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5/6, p.911-922, 1997.

BAYMAN, P.; LEBRÓN, L. L.; TREMBLAY, R.; LODGE, J. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). **New Phytologist**, Cambridge, v. 135, n. 1, p. 143-149, Jan. 1997.

BAYMAN, P.; ANGULO-SANDOVAL, P.; BÁEZ-ORTIZ, Z.; LODGE, J. D. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 8, p. 944-948, Aug. 1998.

BASHYAL, B. P.; WIJERATNE, E. M. K.; FAETH, S. H.; GUNATILAKA, A. A. L. Globosumones A-C, Cytotoxic Orsellinic Acid Esters from the Sonoran Desert Endophytic Fungus *Chaetomium Globosum*. **Journal of Natural Products**, v.68, p.724-728, 2005.

BASTOS, C. N. Antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer, causador da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Revista Theobroma**, v. 8, p. 147-150.

BENHAMOU, N.; GARAND, C. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **Phytopathology**, v.91, n.8, p.730-740, 2001.

BENHAMOU, N.; BRODEUR, J. Evidence for Antibiosis and Induced Host Defense Reactions in the Interaction Between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the Causal Agent of Green Mold. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 932-943, 2000.

BERGSMAN-VLAMI, M. et al. Assessment of genotypic diversity of antibiotic-producing *Pseudomonas* species in the rhizosphere by denaturing gradient gel electrophoresis. **Appl Environ Microbiol.**, v. 71, n. 2, p. 993-1003, 2005.

BERJAMIM FILHO, A. Alternativas para o controle do Mal das Folhas da seringueira: uma revisão. **Suma Phytopatologica** 8. 1982.

BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 55, p. 644-653, 1977.

- BILLS, G. F. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.) **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul: APS Press, p. 31-65. 1996.
- BILLS, G.F.; POLISHOOK, J.D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. **Canadian Journal of Botany**, 69, 1477-1482. 1991.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Recovery of endophytic fungi from *Chamaecyparis thyoides*. **Sydowia**, Horn, v. 44, n. 1, p. 1-12, 1992.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. **Mycologia**, New York, v. 86, n. 2, p. 187-198, Mar. /Apr. 1994a.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Microfungi from decaying leaves of *Heliconia mariae* (Heliconiaceae). **Brenesia**, San Jose, v. 41/42, p. 27-43, 1994b.
- BING, L. A.; LEWIS, L. C. Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsanto) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. And virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hubner). **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 45, p. 147-156, 1993.
- BIONDI, N. Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3313-3320, 2004.
- BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, A new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1447-1448, 2000.
- BREINBAUER, R.; MANGER, M.; SCHECK, M.; WALDMANN, H. Natural Product Guided Compound Library Development. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 23, p. 2129-2145, 2002.
- BRITTO, K. C. **Isolamento e atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Monografia do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco, Brasil. 20pp. 1998.
- BROOKS, S. D.; GONZALEZ, C. F.; APPEL, D. N.; FILER, T. H. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for *Oak Wilt*. **Biological Control**, v. 4, p. 373-381, 1994.
- BURGESS, T. I.; GORDON, T. R.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. Geographic isolation of *Diplodia scrobiculata* and its association with native *Pinus radiata*. **Mycological Research**, v. 108, p. 1399-1406, 2004.
- CAMARGO, A. P. Aptidão climática para heveicultura no Brasil. **Ecosistema**, 1, 6-14. 1976.
- CAMARGO, L. E.A.; PEREIRA, O. A. P.; DE CARVALHO, R. V. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 477-488, 2005.
- CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R. T. da; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern *Brazilian apple* (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 397-402, 2005.

- CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 2, p. 210-220, Mar./Apr. 2002.
- CANNON, P. I.; CAMARAN, C. C.; ROMERO, A. I. Studies on biotrophic fungi from Argentina: *Microcyclus porleriae*, whit a key to South American species of *Microcyclus*. **Mycological Research**, v. 99, p. 353-356, 1995.
- CARROL, G.C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema, N. J., Heuvel, J.V. den (Editors). **Microbiology of phyllosphere**. London: Cambridge University, pp. 205-222. 1986.
- CARROL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, 69:2-9. 1988.
- CARROLL, G. C. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. S1316-S1324, 1995. Supplement 1.
- CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 56, n. 24, p. 3034-3043, Dec. 1978.
- CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p. 2-9, 1988.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungal in sterile distilled water, for the researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 70, n. 8, p. 181-184. 1967.
- CAYLA, V. Maladies cryptogamiques des feuilles de l'H en Amerique. **J. Agric. Trop.** 13: 186-188. 1913.
- CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 2005.
- CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, n. 3, p. 321-322, Mar. 1995.
- CHANWAY, C. P. Bacterial endophytes: ecological and pratical implications. **Sydowia**, 50: 149-170. 1998.
- CHEE, K. H. Factors affecting discharge, germination and viability os spores of *Microcyclus ulei*. **Transactions os the British Mycological of Society**, v. 66, p. 499-504, 1976.
- CHEE, K. H. Management of South America leaf blight. **Planter**. 56: 314-325. 1980.
- CHEE, K. H.; HOLLIDAY, P. South american leaf blight of Hevea rubber. **Malaysia R Rubber Research Development Board**. Kuala Lumpur, Malasya, 1986.
- CHRISTENSEN, M. J. Antifungal activity in grasses infected with Acremonium and Epichloe endophytes. **Australas Plant Patology**, v. 3, p. 186-191, 1996.
- CISAR, C. R.; TeBEEST, D. O.; Mating system of the filamentous ascomycete, *Gromerella cingulata*. **Current Genetics**, v.35, p.127-133, 1999.

- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, v.69, p.10-16, 1988.
- CLAY, K. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: Coevolution and the change from parasitism to mutualism. Academic Press, London, 79-105. 1998.
- CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, v. 160, p. S99-S127, 2002.
- CORRADO, M.; RODRIGUES, K. F. Antimicrobial evolution of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v.44, n.2, p.157-160, 2004.
- COSTA, R. B.; RESENDE, M. D. V.; ARAÚJO, A. J.; GONÇALVES, P. S.; BORTOLETTO, N. Seleção combinada univariada e multivariada aplicada ao melhoramento genético da seringueira. **Revista Agropecuária Brasileira**. 1(2), 381-388. 2000.
- COSTA, R. B.; GONÇALVES, P. S.; ODALIA-RÍMOLI, A.; ARRUDA, E. J. Melhoramento e conservação genética aplicados ao Desenvolvimento Local – o caso da seringueira (*Hevea* sp). **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. Vol. 1, N. 2, p. 51-58. 2001.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity; a continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v.77, n.1, p.7-24, 2005.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19: 11-15. 1987.
- DEAN, R. A.; TALBOT, N. J.; EBBOLE, D. J.; FARMAN, M. L.; MITCHELL, T. K.; ORBACH, M. J. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* **Nature**, v. 434, p. 980-986, 2005.
- DEYRUP, S. T.; SWENSON, D. C.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. *Caryophyllene sesquiterpenoids* from a fungicolous isolate of *Pestalotiopsis disseminata*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 608-611, 2006.
- DNASTAR. **Laser gene software**, Version 7.0. 2006.
- DUIJFF, B. J.; GIANINAZZI-PEARSONAND, V.; LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytologist**, v. 135, p. 325-334, 1997.
- FAHEY, J.W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. *In*: CUTLER, H. O. (editor). **Biologically active natural products. Potential use in agriculture**. Washington: American chemical Society Symposium Ser. 380. 1988.
- FARR, D. F.; BILLS, G. F.; CHAMURIS, G. P.; ROSSMAN, A. Y. **Fungi on plants and plant products in the United States**. St. Paul: APS Press, 1995. 1251p.
- FELLER, I. C. The effects of nutrient enrichment on growth and herbivory in dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle* L.). **Ecological Monographs**, v. 65, p. 477-505, 1995.
- FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E.; CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; PINTO, N.F.J.A. Doenças de Milho, Podridões do colmo e das raízes. Sistema de Produção 1. Embrapa Milho e Sorgo. 2006.

FIGUEIREDO, M. B.; PIMENTEL, C. P. V. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. **Summa Phytopathologica**, v. 1, p. 299-302, 1975.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 86, n. 1, p. 153-156, 1986.

FISHER, P. J.; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 120, n. 1, p. 137-143, Jan. 1992.

FRANKEN, P.; BUTEHORN, B.; VARMA, A. 1998. *Piriformospora indica*, a cultivable root cell-infecting fungus promotes the growth of a broad range of plant species. In: **International Conference on Mycorrhiza**. Swenden, v. 2, 1998.

FREIRE, F. C. O.; BEZERRA, J. L. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 304-308, jul. /set. 2001.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 10, p. 1202-1212, Oct. 2000.

FURTADO, E.L. Comportamento de cultivares de seringueira (*Hevea* spp.) frente ao mal das folhas na região do vale do Ribeira, SP. (Tese de Doutorado). Piracicaba. ESALQ. 1996.

GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**, St. Louis, v. 33, n. 2, p. 352-360. 2001.

GAMBOA, M. A.; LAUREANO S.; BAYMAN P. Measuring Diversity of Endophytic Fungi in Leaf Fragments: Does Size Matter? **Mycopathologia**, v. 156, p. 41-45, 2002.

GAMEIRO, A. H. Importação e produção de borracha natural no Brasil: período de 1992 a 2002. Disponível em: <http://www.borrachanatural.org.br>. Acesso em: 22 dez.2005.

GAMS, W.; VAN DER AA., H.A.; VAN DER PLAATS-NITERINK, A.J.; SAMSON, R.A.; STALPERS, J.A. CBS Course of Mycology. BAARN: Centralalbureau voor Schimmelcultures. 3ª ed. Institute of the Royal Netherlands. Academy of Arts and Science. 1987.

GAO, X. X.; ZHOU, H.; XU, D. Y.; YU, C. H.; CHEN, Y. Q.; QU, L. H. High diversity of endophytic fungi from pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivationindependent approach. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, p. 255-266, 2005.

GARCIA, D.; MATTOS, C. R. R.; GONÇALVES, P. de S.; LE GUEN, V. Selection of rubber clones for resistance to South american leaf blight and latex yield in the germplasm of the Michelin plantation of Bahia (Brazil). **J. Rubb. Res**, v. 7, n. 3, p. 188-198, 2004.

GARCÍA-PAJÓN, C. M.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 4, p.426-431, 2003.

GARDES, M.; T. D. BRUNS. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2,p. 113-118, 1993.

GASONI, L.; GURFINKEL, B. S. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. **Mycological Research**, v. 101, n. 7, p. 867-870, 1997.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F. A.; Mal das folhas da seringueira. In: FERREIRA, F. A. **Patologia Florestal: Principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de investigações florestais, p. 289-313. 1989.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F.A.; LIMA, M.I.P.M., PEREIRA, J.C.R.; SANTOS, A.F. **Enfermidades da Seringueira no Brasil**. Manaus, Embrapa-CPAA, 1990. p.169. (Série Embrapa Circular Técnica IV).

GASPAROTTO, L.; JUNQUEIRA, N. T. V. Ecophysiological variability of *Microcyclus ulei*, caused agent of rubber tree leaf blight . **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 1994.

GASPAROTTO, L.; SANTOS, A. F. dos; PEREIRA, J. C. R.; FERREIRA, F. A. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1997. 168 p.

GASPAROTTO, L., TRINDADE, D.R.; SILVA, H.M. **Doenças da seringueira**. Manaus: EMBRAPA/CNPQ, Circular Técnica, v. 4, 1984.

GASPAROTTO, L.; SANTOS, A. F. dos; PEREIRA, J. C. R.; FERREIRA, F. A. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1997. 168 p.

GASPAROTTO, L.; ZAMBOLIM, L.; RIBEIRO DO VALE, F. X.; MAFFIA, L.; JUNQUEIRA, N. T. V. Epidemiologia dos mal da folhas da seringueira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 65-70, 1989b.

GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; FREITAS, R.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 43-50, 1998.

GONÇALVES, P. S.; ORTOLANI, A. A.; CARDOSO, M. Melhoramento genético da seringueira: uma revisão. Campinas : Instituto Agrônômico. 1997. 55p.

GONÇALVES, P.S.; SAES, L. A.; FURTADO, E. L.; SABUGARO, R.; SAKAI, M. Clones promissores de seringueira para a região do vale do Ribeira, São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.35, n.12, p.2343-2353. 2000.

GRISSELL, E. E.; SCHAUFF, M. E. A synopsis of the seed-feeding genus *Bephratelloides* (Chalcidoidea: Eurytomidae). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 92, p. 177-187, 1990.

GUNATILAKA, A. L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Journal of Natural Product**, v. 69, n. 3, p. 509 -526, 2006.

GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto, 2006.

GUO, L. D.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y. Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytologist**, Cambridge, v. 147, n. 3, p. 617-630, 2000.

GUO, L. D.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistonia chinensis* based on rDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2001.

- HALLÉ, F.; OLDEMAN, R. A.; TOMLINSON, P. B. **Tropical trees and forest**. Berling: Springer-Verlag, 1978. 441p.
- HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**. V.102, p. 155-162. 1996.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RIAN, P. D. 2001. Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Version. 1.37. 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 12.jan.2007.
- HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; FORD, E. J.; STROBEL, G. A.; PORCO, J. A.; TOMER, D. P.; ONEILL, K. L.; HEIDER, E. M.; GRANT, D. M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v. 59, n. 14, p. 2471-2476, 2003.
- HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v.5, n.7, p.294-300, 2000.
- HASHIM, I. Induced Resistance of Hevea to South American Leaf Blight by Incompatible Races of *Microcyclus ulei*. **Journal of Natural Rubber Research**. 1(3), 195-201. 1986.
- HASHIM, I.; PEREIRA, J. C. R. Influence of Resistance Hevea on Development of *Microcyclus ulei*. **Journal of Natural Rubber Research**. 4(3), 212-218. 1989.
- HATA, K.; ATARI, R.; SONE, K. Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. **Mycoscience**, Tokyo, v. 43, p. 369-373, 2002.
- HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 9-18, 2004.
- HENKEL, T.; BRUNNE, R. M.; MULLER, H.; REICHEL, F. Statistical investigation into the structural of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie-International Edition**, v.38, p.643-647, 1999.
- HENNINGS, P. Über die auf *Hevea* – arten bisher beobachteten parasitischen pilze. **Notizbl. Bot. Gart. Mus. Berl.** 4: 133-138. 1904
- HOLLIDAY, P. Dispersal of conidia of *Dothidella ulei* from *Hevea brasiliensis*. **Annals of Applied Biology**, v. 63, n. 3, p. 435-437, 1969.
- HOLLIDAY, P. **South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis***. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute. 1970. 31p.
- HORMAZABAL, E.; HIRSCHMANN, G. S.; ASTUDILLO, L.; RODRÍGUEZ, J.; THEODULOZ, C. Metabolites from *Microsphaeropsis olivacea*, an endophytic fungus of *Pilgerodendron uviferum*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.60, p.11-21, 2005.
- HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities and endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei*, *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.31, p.163-167, 2001.

IDRIS, R.; TRIFONOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W. W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2667-77, 2004.

JACOBS, M. J.; BUGDEE, W. M.; GABRIELSON, D. A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.1262-1265, 1985.

JARVIS, B. B.; MIDIWO, J. O.; BRAN, G. A.; ABOULNASR, M. B.; BARROS, C. S. The mystery of trochothecene antibiotics in *Baccharis* species. **Journal of Natural Products**, v.51, p.736-744, 1988.

JOHNSTON, P. R. Leaf endophytes of manuka (*Leptospermum scoparium*). **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 8, p. 1009-1016, 1998.

JUNQUEIRA, N. T. V.; CHAVES, G. M.; ZAMBOLIM, L.; ALFENAS, A. C. & GASPAROTTO, L. Reação de clones de seringueira a vários isolados de *M. ulei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, p. 877-893, 1988a.

JUNQUEIRA, N. T. V.; GASPAROTTO, L.; MORAES, V. H. F.; SILVA, H. M.; LIM, T. M. New diseases caused by vírus, fungi and also a bacterium on rubber from Brazil and their impact on international quarantine. In: REGIONAL CONFERENCE ON PLANT QUARANTINE, SUPPORT FOR AGRICULTURAL DEVELOPMENT, 1985. Kuala Lumpur. **Proceedings**. Serdang: ASEAN, P. 253-270, 1988b.

JUNQUEIRA, N. T. V.; GASPAROTTO, L.; Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. **Documentos** 15. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA. Brasília, DF. Cap. 22, p.307-331. 1991.

JUNQUEIRA, N. T. V.; LIMA, M. I. P. M.; GASPAROTTO, L.; LUIZ, A. J. B. Controle integrado do mal das folhas da seringueira. **Pesq. Agrpec. Bras.** Brasília. 27(7):1027-1034. 1992.

KISHORE, K. H.; MISRA, S.; CHANDRA, D. R.; PRAKASH, K. V. V. R.; MURTY, U. S. Antimicrobial efficacy of secondary metabolites from *Glomerella cingulata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 150-152, 2007.

KUMAR, D. S. S.; LAU, C. S.; WAN, J. M. F.; YANG, D.; HYDE, K. D. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothoes*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. **Life Sciences**, v. 78, p. 147-156, 2005.

KOBAYASHI, M.; KANASAKI, R.; EZAKI, M.; SAKAMOTO, K.; TAKASE, S.; FUJIE, A.; HINO, M.; HORI, Y. FR227244, a Novel Antifungal Antibiotic from *Myrothecium cinctum* No. 002. **The Journal of antibiotics**, v. 57, n. 12, 2004.

KUYPER, J. Eine *Hevea* blattkrankheit in Suriname. **Rec. Trav. Bot. Neerl.** 8: 371-379. 1911.

LANGFORD, M. H. South American leaf blight of hevea rubber-tress. **Washington V. S. Dep. Agric. Tec. Bull.** 882p. 1945.

LANGFORD, M. H. *Hevea* diseases of the Amazon valley [*Hevea brasiliensis*, Mal das folhas; Mancha da folha; Morte lenta; Brasil]. **Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Norte (Brazil)**, Bélem – Pará, n. 27, 1953, 29p.

LE GUEN, V.; MATTOS, C. R. R.; GUYOT, J.; SEGUIN, M.; GARCIA, D. Reduced fungal dissemination involved in a rubber tree durable resistance to *Microcyclus ulei* (submitted in plant disease).

LEE, J. E. L.; PLIAM, N. B.; STROBEL, J. A. ; CLARDY, J. Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, p. 7076-7077, 1995.

LEROUX, P. Recent developments in the mode action of fungicides. **Pesticide Science** , v.47, p.191-197, 1996.

LI, X.; KIM, M. K.; LEE, U.; KIM, S. K.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; SON, B. W. Myrothenones A and B, cyclopentenone derivatives with tyrosinase inhibitory activity from the marine-derived fungus *Myrothecium* sp. **Chemical; Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 4, p. 453-455, 2005.

LI, J. Y.; STROBEL, G. A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 261-265, 2001.

LIU, C. H.; ZOU, W.X.; LU, H.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v.88, p.277-282, 2001.

LIU, C. H.; HUANG, L. L.; YE, Y. H.; ZOU, W.X.; GUO, Z. J.; TAN, R. X. Antifungal and new metabolites of *Myrothecium* sp. Z16, a fungus associated with white croaker *Argyrosomus argentatus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 1, p. 195-202, 2006.

LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi on *Manilkara bidentata* in Puerto Rico. **Mycologia**, New York, v. 88, n. 5, p. 733-738, Sept. /Oct. 1996.

LOURD, M. Os principais patógenos das plantas cultivadas na Ilha do Careiro. **Amazoniana**, v. 12, p. 565-576, 1993.

LU, H.; ZOU, W.X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., and endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v.151, p.67-73, 2000.

M'PIGA, P.; BELANGER, R. R.; PAULITZ, T. C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporium* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, p. 301-320, 1997.

MADDAU, L.; LANALDEDDU, B. T.; FRANCESCHINI, A. Antagonistic interactions between fungal endophytes and pathogens involved in oak decline. **Journal of Plant Pathology**, v. 87, n. 4, p. 297, 2005.

MAGALHÃES, A. **Isolamento e variabilidade genética detectada por RAPD do fungo endofítico *Guignardia* sp. de *Himatanthus sucuba* SPRUCE (WOOD) Apocynaceae**. São Carlos, 2001. 130 f. Tese (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

MAITAN, V. R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira)**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás, 1998. 122p.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Tese de doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

- MALINOWSKI D. P.; BELESKY D. P. *Neotyphodium coenophialum* – endophytic infections affects the ability of tall fescue to use sparingly available phosphorus. **J. plant nutr.**, v. 22, p. 835-853, 1999.
- MARCON, J. **Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de *Citrus* sp. e interação com *Xylella fastidiosa***. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2002.
- MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. Tese de doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- MATTOS, C. R. R.; GARCIA, D.; PINARD, F.; LE GUEN, V. Variability of *Microcyclus ulei* isolates from Southeast Bahia. **Fitopatologia Brasileira**. Vol.28, no.5, p.502-507. 2003.
- MELLO, S. C. M.; FRAZÃO, H. S. & SILVA, J. B. T. Capacidade germinativa e infectiva de isolados de *Dicyma pulvinata* antagonicos a *Microcyclus ulei* mantidos em coleção de cultura. **Agrociência**, v. 9,p. 921-926, 2005.
- MELLO, S. C. M.; SANTOS, M. F.; SILVA, J. B. T. Isolados de *Dicyma pulvinata* em estromas de *Microcyclus ulei* em seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 359-363, 2006.
- MCINROY, J.C.; KLOEPPER, J.W. Novel bacterial taxa inhabiting internal tissue of sweet corn and cotton. *In*: **“Improving plant productivity with rhizosphere bacterial”**. RYDER, M.H., STEPHENS P.M., BOWEN, G.G. (eds.). 1994. 190 pp.
- MCINROY, J.C.; KLOEPPER, J.W. Survey of inigeous bacterial endophytes from cotton an sweet corn. **Plant and soil**, 173: 337-342. 1995.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. 325pp. 1998.
- MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. (Ed.). **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, 1998. 555 p.
- MENEZES, M.; ASSIS, S. M. **Guia Prático de Fungos Fitopatogênicos**. Recife: Imprensa Universitária, Universidade Federal de Pernambuco. 2004. 183p.
- MIYAZAWA, M.; HONJO, Y.; KAMEOKA, H. Biotransformation of the sesquiterpenoid (+)- γ -Gurjunene using a plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*, as a biocatalyst. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1283-1285, 1998.
- MILLER, J. W. Differential clones of *Hevea* for identifying races of *Dothidella ulei*. **Pl. Dis. Repr.** 50: 187-190. 1966.
- MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p.808-811, 1990.
- MULLER, E.; VON ARX, J. A. Die gattugen der didymosporen Pyrenomyceten. **Beitr. Kryptog. Flora Schweiz**. 11:373. 1962.
- NAIK, B. S.; SHASHIKALA, J.; KRISHNAMURTHY, Y. L. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. **Microbiological Research**, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1022-1037, 2003.

NIERE, B. I. **Significance of non-pathogenic isolates of non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* Schlecht.: Fries for the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne on tissue cultured banana.** Ph.D. Thesis. Germany. Bonn Universität. 2001. 118 p.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information (NCBI).** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 25 apr. 2007.

NILTON, T.V.; JUNQUEIRA, L. M.; GASPAROTTO, L.; Luis, A.J. Integrated control of rubber tree leaf Blight association between genetic resistente and chemical control. **Pesq. Agropec. Bras.** V. 27, n.7, p. 1027-1034, 1992.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 657-663, 1998.

PAN, M. J.; RADEMAN, S.; KUNERT, K.; HASTINGS, J. W. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp.cubense race 4 by the endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. **Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift**, v. 145, p. 479-486, 1997.

PAULUS, B.; GADEK, P.; HYDE, K. Estimation of microfungi diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: the effects of leaf storage and surface treatment. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 6, p. 748-756. 2003.

PELÁEZ, F.; COLLADO, J.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; DÍEZ MATAS, M.T.; GARCÍA, J.B.; GONZÁLES DEL VAL, A.; GONZÁLES, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; MARTÍN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, v. 102, p. 755-761, 1998.

PEREIRA JO, AZEVEDO JL, PETRINI O. Endophytic Fungi of Stylosanthes: A First Report. **Mycologia**, v. 85, p. 362-364, 1993.

PETCH, T. Leaf disease of *Hevea*. **Trop. Agriculturist**. 42: 268. 1914.

PETERS, A.F. Field and culture studies of *Streblonema-Macrocystis* new species *Ectocarpales Phaeophyceae* from Chile, a sexual endophyte of giant kelp. **Phycologia**, v. 30, p.365-377, 1991.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSKI, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, C. G.; GRIGOLLETI JUNIOR, A. Fungos endofíticos em folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, Curitiba, v. 36, n. 1, p. 123-128, 2006.

PETRINI, O.; FISHER, P. J. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 87, n. 4, p. 647-651, Dec. 1986.

PETRINI, O.; HAKE, U.; DREYFUSS, M. M. An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. **Mycologia**, New York, v. 82, n. 4, p. 444-451, July/Aug. 1990.

PETRINI, L. E.; MÜLLER, E. Haupt-Und Nebendfruchtformen europäischer *Hypoxylon*-Arten (Xylariaceae, Sphaeriales) and verwandter Pilze. **Mycology Helvetica**, 1: 501-627. 1986.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, Hoboken, v. 1, p. 185-196, 1992.

- PETRINI, O. Fungal endophyte os tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. Washington: Springer Verlag, p. 179-197, 1991.
- PETRINI, O.; PETRINI, L.; RODRIGUES, K. F. Xylariaceous endophytes: an exercise in biodiversity. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 531-539, dez. 1995.
- PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1508-1513, Dec. 2001.
- PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. Tese de doutorado – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- PINTO, N.F.J.A. Podridão branca da espiga do milho. 1. ed. **Comunicado Técnico 141**. Embrapa milho e sorgo. Sete Lagos, Minas Gerais. 2006
- POCASANGRE, L. E. **Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)**. Tesis Ph.D. Bonn, Germany. Universität, Bonn. 2000. 117 p.
- POLISHOOK, J. D.; BILLS, G. F.; LODGE, D. J. Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. **Journal of Industrial Microbiology**, v 17, p. 284-294, 1996.
- RAGAZZI, A.; MORICCA, S.; CAPRETTI, P.; DELLAVALLE, I. Endophytic presence of *Discula quercina* on declining *Quercus cerris*. **Journal of phytopathology**, v. 147, n. 7-8, p. 437-440, 1999.
- RAGAZZI, A.; MORICCA, S.; CAPRETTI, P.; DELLAVALLE, I.; MANCINI, F.; TURCO, E. Endophytic fungi in *Quercus cerris*: isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected. **Phytopathol. Mediterr.**, v. 40, p. 165-171, 2001.
- RAGAZZI, A.; MORICCA, S.; CAPRETTI, P.; DELLAVALLE, I.; TURCO, E. Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy. **Forest Pathology**, v. 33, p. 31-38, 2003.
- RAJKUMAR, M.; LEE W. H.; LEE K.J. Screening of bacterial antagonists for biological control of Phytophthora blight of pepper. **J Basic Microbiol**, v. 45, n. 1, p. 55-63, 2005.
- RAYNER, R. W. Latent infection in *Coffea arabica* L. **Nature**, London, v. 161, n. 4085, p. 245-246, 1948.
- REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, Cambridge, v. 151, n. 3, p. 705-716, Sept. 2001.
- REHNER, S. A.; UECKER, F. A. Nuclear ribossomal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 72, n. 11, p. 1666-1674, Nov. 1994.
- ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAN, P. Solid-state fermentation: a promosing microbial technology for secondary metabolites production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 284-289, 2001.

- ROCHA, H. M.; VASCONCELOS FILHO, A. P. Epidemiology of the South American leaf blight of rubber in the region of Ituberá, Bahia, Brazil. **Turrialba**, v. 28, n. 4, p. 325-329, 1978.
- RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, New York, v. 86, n. 3, p. 376-385, May/June 1994.
- RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, p. 131-135, 1999.
- RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v.40, p.261-267, 2000.
- RODRIGUES-HEERKLOTZ, K. F.; DRANDAROV, K.; HEERKLOTZ, J.; HESSE, M.; WERNER, C. Guignardic acid, a novel type of secondary metabolite produced by the endophytic fungus *Guignardia* sp.; isolation, structure elucidation, and asymmetric synthesis. **Helvetica Chimica Acta**, v. 84, p. 3766-3772, 2001.
- ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: GELVIN SB, SCHILPEROORT RA. **Plant molecular biology manual**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.
- ROMERO, I. A. C.; ARISTIZÁBAL, F. A.; CASTAÑO, D. M. Revisión sobre el hongo *Microcyclus ulei*, agente causal del mal suramericano de la hoja del caucho. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 8, n. 2, p. 50-59, 2006.
- RUBINI, M. R. **Microbiota endofítica de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) eo controle biológico de *Crinipellis pernicioso***. Dissertação de Mestrado – Universidade de Caxias do Sul. São Paulo, 2003. 100 p.
- RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.V.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; SANTOS, D.R.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom disease. **Internatinal Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 24-33, 2005.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology Evolution and Sistematics**, v.29, p.319-343, 1998.
- SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2005.
- SAS Institute. SAS/STAT User's Guide. Cary, North Carolina, Version 9.1, Vol I-III. 1989.
- SCHULZ, B., ROMMER, K., DAMMANN, U., AUST, H.J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, v. 82, (103), p.1275-1283, 1999.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophyte fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, n.9, p.996-1004, 2002.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n.6, p.661-686, 2005.
- SCHUSTER R.P., R.A. SIKORA; N. AMIN. Potential of endophytic fungi for the biological control of plant parasitic nematodes. **Med. Fac. Landbouww.**

University of Gent. v. 60, n. 3, p. 1947-1952. 1995.

SCHWARZ, M.; KÖPCKE, B.; WEBER, R. W.; SteRner, O.; ANKE, H. 3-hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 65, n. 15, p. 2239-2245, 2004.

SETTE, L.D.; PASSARINI, M.R.Z.; DELARMELINA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M.C.T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1185-1195, 2006.

SHERWOOD-PIKE, M.; STONE, J. K.; CARROLL, G. C. *Rhabdocline parkeri*, a ubiquitous foliar endophyte of Douglas fir. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 64, n. 9, p. 1849-1855, Sept. 1986.

SCHUBERT, K.; RITSCHEL, A.; BRAUN, U. A monograph of *Fusicladium* lat. (Hyphomycetes). **Schlenchtendalia**, v. 9, p. 353-356, 2003.

SIEGAL, M. R.; LATCH, G. C. M.; JOHNSON, M. C. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review Phytopathology**, 25: 293-315. 1987.

SILVA, R. L. de O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTI, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta bot. bras**, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SINCLAIR, J. B.; CERKAUSKAS, R. F. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.) **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul: APS Press, 1996. p. 03-29.

SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A.; SAVARD, M. E.; BLACKWELL, B. A.; NELSON, P. E. Isolation and characterization of new chlamydosporol related metabolites of *Fusarium chlamydosporum* and *Fusarium trincinctum*. **Mycopathologia**, v.127, p.95-101, 1994.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.)rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 185-195, 2004.

SPEIJER, P. R.; SIKORA, R. A. Influence of a complex involving *Pratylenchus goodeyi* and non pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* on banana root health. In C.S. Gold; B. Gemmill. **Biological and Integrated Control of Highland Banana and Plantain Pests and Diseases**. Cotonou, Benin, p. 231-239, 1993.

SREENIVASAPRASA, D. S.; MILLS, P. R.; MEEHAN, B. M., BROWN, A. E. Phylogeny and systematics of 18 Colletotrichum species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome**, v. 39, n. 3, p. 499-512, 1996.

STAHEL, G. De Zuid-Amerikaansche hevea-bladziekte veroorzaakt door *Melanopsammopsis ulei* nov. gen. **Meded. Dep. Landb. Suriname**. 34, 111p. 1917.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 137-141, 2001.

- STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.
- STANOSZ, G. R.; SMITH, D. R.; LEISSO, R. Diplodia shoot blight and asymptomatic persistence of *Diplodia pinea* on or in stems of jack pine nursery seedlings. **Forest Pathology**, v. 37, p. 145-154, 2007.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic **Fungus of Pacific Yew**. *Science*, 260: 214-216. 1993.
- STINSON, M.; EZRA, D.; HESS, W. M.; SEARS, J.; STROBEL, G. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, v. 165, p. 913-922, 2003.
- STONE, J.K. Foliar endophytes of *Pseudotsuga menziesli* (Mirb.) Franco. Cytology and physiology of the host-endophyte relationship. Tese de Doutorado. University of Oregon. Eugene, 124 p. 1986.
- STROBEL, G.A. Microbial gifts from rain forests. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, p. 14-20, 2001.
- STROBEL, G. A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; FUNG, P. C. W.; CHAU, R. M. W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, v. 60, 179-183, 2002.
- STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.
- SURYANARAYANAN, T.S.; MURALI, T. S.; VENKATESAN, G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical across a rainfall gradient. **Canadian journal of botany**, v. 80, p. 818-826, 2002.
- SURYANARAYANAN, T.S.; VENKATESAN, G.; MURALI, T.S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: Diversity and distribution patterns. **Current Science**, v. 85, p. 489-493, 2003.
- SURYANARAYANAN, T.S.; WITTLINGER, S. K.; FAETH, S. H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. **Mycological research**. v. 109, p. 635-639, 2005
- SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 93, n. 1, p. 88-90, 2002.
- TEIXEIRA, L. C. S. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas de ecossistemas de ipucas no Estado do Tocantins**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2007.
- TEJESVI, M. V.; MAHESH, B.; NALINI, M. S.; PRAKASH, H. S.; KINI, K. R.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H. S. Fungal endophyte assemblages from ethnopharmaceutically important medicinal trees. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 427-435, 2006.
- THORNTHWAITE, C. W.; MATHER, J. R. Climate in relation to crops. **Meteorological Monographs**. 2(8): 1-10. 1954.

- TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; KUROZAWA, C. Ação "*in vitro*" de fungicidas no crescimento micelial e germinação de conídios de *Alternaria solani*, agente causal da pinta preta do tomateiro. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 70, n. 3, p. 337-345, 2003.
- TURNER, J. T., Kelly, J. L., Carlson, P. S. **Endophytes**: an alternative genome for crop improvement. Madison: printed in International Crop Science. 1993.
- VARMA, A.; VERMA, S.; SUDHA, S. N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2741-2744, 1999.
- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.
- VERDINE, G. L.; The combinatorial chemistry of nature. **Nature**, v.384, p.11-13 (supplement), 1996.
- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.
- XU, J.; TAKASAKI, A.; KOBAYASHI, H.; ODA, T.; YAMADA, J.; MANGINDAAN, R. E.; UKAI, K.; NAGAI, H.; NAMIKOSHI, M. Four new macrocyclic trichothecenes from two strains of marine-derived fungi of the genus *Myrothecium*. **The journal of antibiotics**, v. 59, n. 8, p. 451-455, 2006.
- WAGENAAR, M.M. **Isolation and characterization of biologically active small molecules from fungi and combinatorial peptide libraries**. Dissertation, Ph.D., Cornell University, Graduate School, Ithaca, NY (USA). 2001. 254p.
- WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS-Microbiology Letters**, 193: 249-253. 2000.
- WANG, F.W.; JIAO, R.H.; CHENG, A.B.; TAN, A.H.; SONG, Y.C. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p. 79-83, 2006.
- WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; GOGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents, VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2325-2327, 1971.
- WHITE Jr., J. F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A. C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of Acremonium endophytes. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 44, p. 13-37, 1993.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand M.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (Eds.), **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. New York : Academic Press, pag 315-322. 1990.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, 73:274-276. 1995.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, M.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; KANJANA, K. D.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.265-272, 2004.

WOODRUFF, H.B. Natural products from microorganisms: an odyssey revisited. **Actinomycetologica**, 13:58-67. 1999.

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S. Preliminary study of vincristine-producing endophyte fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao**, v.35, n.1, p.79-81, 2004.

ZAMIR, L.O.; DEVOR, K. A.; NIKOLAKAKIS, A.; NADEAU, Y.; SAURIOL, F. Structures of New Metabolites from *Fusarium* Species: an Apotrichothecene and Oxygenated Trichodienes. **Tetrahedron Letters**, v.33, n.36, p.5181-5184, 1992.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.; TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mangolica*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1529-1530, 2000.

APÊNDICES

Apêndice A. Lista dos indivíduos de *Hevea brasiliensis* utilizados no presente trabalho.

Variedade de <i>H. brasiliensis</i>	Indivíduos coletados	Localização	Altitude
FX3864	A	13°47'49,6" S 39°09'15,4" W	42 m
	B	13°47'49,6" S 39°09'15,3" W	42 m
	C	13°47'49,5" S 39°09'15,9" W	42 m
	D	13°47'51,0" S 39°09'17,3" W	42 m
	E	13°47'51,7" S 39°09'18,0" W	45 m
CDC312	A	13°47'52,9" S 39°09'16,9" W	50 m
	B	13°47'52,4" S 39°09'17,1" W	50 m
	C	13°47'52,1" S 39°09'17,1" W	50 m
	D	13°47'52,0" S 39°09'16,6" W	50 m
	E	13°47'52,2" S 39°09'15,9" W	50 m
MDF180	A	13°47'44,3" S 39°09'18,0" W	34 m
	B	13°47'44,2" S 39°09'17,5" W	35 m
	C	13°47'43,8" S 39°09'17,6" W	37 m
	D	13°47'53,6" S 39°09'18,0" W	36 m
	E	13°47'42,5" S 39°09'18,8" W	33 m

Apêndice B. Dados de contagem de conídios e porcentagens de germinação dos campos visualizados ao microscópio óptico (objetiva 10X) nos testes de germinação de conídios da variedade fisiológica de *M. ulei* PMB 26

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
Controle	1	50	65	102	63,73%
Controle	1	50	47	77	61,04%
Controle	1	50	82	126	65,08%
Controle	1	50	51	73	69,86%
PMBCDC70	1	50	54	87	62,07%
PMBCDC70	1	50	68	109	62,39%
PMBCDC70	1	50	47	73	64,38%
PMBCDC70	1	50	69	104	66,35%
PMBCDC61	1	50	0	66	0,00%
PMBCDC61	1	50	0	91	0,00%
PMBCDC61	1	50	0	109	0,00%
PMBCDC61	1	50	0	68	0,00%
PMBMDF92	1	50	0	93	0,00%
PMBMDF92	1	50	6	92	6,52%
PMBMDF92	1	50	0	59	0,00%
PMBMDF92	1	50	0	87	0,00%
PMBCDC35	1	50	49	70	70,00%
PMBCDC35	1	50	23	35	65,71%
PMBCDC35	1	50	24	34	70,59%
PMBCDC35	1	50	46	69	66,67%
PMBCDC124	1	50	2	104	1,92%
PMBCDC124	1	50	3	113	2,65%
PMBCDC124	1	50	0	85	0,00%
PMBCDC124	1	50	2	105	1,90%
PMBCDC115	1	50	29	45	64,44%
PMBCDC115	1	50	33	52	63,46%
PMBCDC115	1	50	25	39	64,10%
PMBCDC115	1	50	29	46	63,04%
PMBMDF48	1	50	49	76	64,47%
PMBMDF48	1	50	25	41	60,98%
PMBMDF48	1	50	28	54	51,85%
PMBMDF48	1	50	28	35	80,00%
PMBMDF28	1	50	37	55	67,27%
PMBMDF28	1	50	36	54	66,67%
PMBMDF28	1	50	27	48	56,25%
PMBMDF28	1	50	28	45	62,22%
PMBCDC139	1	50	32	48	66,67%
PMBCDC139	1	50	38	56	67,86%
PMBCDC139	1	50	41	65	63,08%
PMBCDC139	1	50	45	83	54,22%
PMBMDF31	1	50	0	97	0,00%
PMBMDF31	1	50	0	105	0,00%
PMBMDF31	1	50	0	78	0,00%
PMBMDF31	1	50	0	74	0,00%
PMBMDF21	1	50	18	37	48,65%
PMBMDF21	1	50	28	52	53,85%
PMBMDF21	1	50	34	59	57,63%
PMBMDF21	1	50	23	44	52,27%
PMBCDC43	1	50	27	45	60,00%
PMBCDC43	1	50	50	113	44,25%
PMBCDC43	1	50	24	58	41,38%
PMBCDC43	1	50	21	83	25,30%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBCDC4	1	50	6	95	6,32%
PMBCDC4	1	50	0	94	0,00%
PMBCDC4	1	50	0	78	0,00%
PMBCDC4	1	50	0	72	0,00%
PMBCDC97	1	50	13	75	17,33%
PMBCDC97	1	50	19	67	28,36%
PMBCDC97	1	50	25	75	33,33%
PMBCDC97	1	50	35	76	46,05%
PMBCDC74	1	50	35	52	67,31%
PMBCDC74	1	50	36	51	70,59%
PMBCDC74	1	50	33	50	66,00%
PMBCDC74	1	50	29	46	63,04%
Controle	2	50	48	68	70,59%
Controle	2	50	43	61	70,49%
Controle	2	50	53	74	71,62%
Controle	2	50	73	106	68,87%
PMBCDC118	2	50	9	16	56,25%
PMBCDC118	2	50	45	78	57,69%
PMBCDC118	2	50	29	48	60,42%
PMBCDC118	2	50	20	36	55,56%
PMBMDF54	2	50	0	73	0,00%
PMBMDF54	2	50	0	65	0,00%
PMBMDF54	2	50	0	89	0,00%
PMBMDF54	2	50	0	58	0,00%
PMBCDC123	2	50	30	41	73,17%
PMBCDC123	2	50	32	45	71,11%
PMBCDC123	2	50	37	49	75,51%
PMBCDC123	2	50	33	50	66,00%
PMBMDF78	2	50	20	46	43,48%
PMBMDF78	2	50	12	28	42,86%
PMBMDF78	2	50	23	57	40,35%
PMBMDF78	2	50	15	46	32,61%
PMBCDC47	2	50	9	20	45,00%
PMBCDC47	2	50	17	33	51,52%
PMBCDC47	2	50	11	26	42,31%
PMBCDC47	2	50	14	29	48,28%
PMBMDF83	2	50	35	49	71,43%
PMBMDF83	2	50	23	36	63,89%
PMBMDF83	2	50	18	26	69,23%
PMBMDF83	2	50	22	30	73,33%
PMBCDC73	2	50	11	19	57,89%
PMBCDC73	2	50	15	27	55,56%
PMBCDC73	2	50	10	17	58,82%
PMBCDC73	2	50	15	24	62,50%
Controle	3	50	44	52	84,62%
Controle	3	50	43	49	87,76%
Controle	3	50	39	47	82,98%
Controle	3	50	40	46	86,96%
PMBMDF89	3	50	7	105	6,67%
PMBMDF89	3	50	4	99	4,04%
PMBMDF89	3	50	4	101	3,96%
PMBMDF89	3	50	3	97	3,09%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBMDF71	3	50	4	104	3,85%
PMBMDF71	3	50	0	98	0,00%
PMBMDF71	3	50	0	92	0,00%
PMBMDF71	3	50	2	113	1,77%
PMBCDC116	3	50	86	91	94,51%
PMBCDC116	3	50	79	82	96,34%
PMBCDC116	3	50	83	89	93,26%
PMBCDC116	3	50	71	75	94,67%
PMBCDC50	3	50	58	62	93,55%
PMBCDC50	3	50	65	70	92,86%
PMBCDC50	3	50	64	66	96,97%
PMBCDC50	3	50	59	62	95,16%
PMBCDC63	3	50	49	58	84,48%
PMBCDC63	3	50	42	51	82,35%
PMBCDC63	3	50	54	60	90,00%
PMBCDC63	3	50	51	59	86,44%
PMBCDC136	3	50	37	91	40,66%
PMBCDC136	3	50	37	88	42,05%
PMBCDC136	3	50	32	68	47,06%
PMBCDC136	3	50	33	75	44,00%
Controle	4	50	41	54	75,93%
Controle	4	50	37	48	77,08%
Controle	4	50	64	87	73,56%
Controle	4	50	71	94	75,53%
PMBCDC34	4	50	0	71	0,00%
PMBCDC34	4	50	0	67	0,00%
PMBCDC34	4	50	0	74	0,00%
PMBCDC34	4	50	0	82	0,00%
PMBFX155	4	50	19	20	95,00%
PMBFX155	4	50	33	37	89,19%
PMBFX155	4	50	35	42	83,33%
PMBFX155	4	50	28	33	84,85%
PMBFX13	4	50	47	62	75,81%
PMBFX13	4	50	45	64	70,31%
PMBFX13	4	50	61	80	76,25%
PMBFX13	4	50	69	88	78,41%
PMBFX116	4	50	0	62	0,00%
PMBFX116	4	50	0	94	0,00%
PMBFX116	4	50	0	89	0,00%
PMBFX116	4	50	0	82	0,00%
PMBFX182	4	50	77	99	77,78%
PMBFX182	4	50	70	85	82,35%
PMBFX182	4	50	65	104	62,50%
PMBFX182	4	50	79	99	79,80%
PMBFX32	4	50	0	78	0,00%
PMBFX32	4	50	0	75	0,00%
PMBFX32	4	50	0	69	0,00%
PMBFX32	4	50	0	82	0,00%
PMBFX189	4	50	22	45	48,89%
PMBFX189	4	50	17	34	50,00%
PMBFX189	4	50	20	40	50,00%
PMBFX189	4	50	31	63	49,21%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX63	4	50	6	40	15,00%
PMBFX63	4	50	4	31	12,90%
PMBFX63	4	50	3	19	15,79%
PMBFX63	4	50	3	20	15,00%
PMBFX146	4	50	14	33	42,42%
PMBFX146	4	50	18	35	51,43%
PMBFX146	4	50	11	23	47,83%
PMBFX146	4	50	19	35	54,29%
PMBFX127	4	50	0	64	0,00%
PMBFX127	4	50	0	62	0,00%
PMBFX127	4	50	0	78	0,00%
PMBFX127	4	50	0	69	0,00%
PMBFX35	4	50	48	58	82,76%
PMBFX35	4	50	11	11	100,00%
PMBFX35	4	50	12	18	66,67%
PMBFX35	4	50	11	14	78,57%
PMBFX175	4	50	34	48	70,83%
PMBFX175	4	50	22	30	73,33%
PMBFX175	4	50	22	31	70,97%
PMBFX175	4	50	21	32	65,63%
PMBFX38	4	50	64	78	82,05%
PMBFX38	4	50	65	75	86,67%
PMBFX38	4	50	62	72	86,11%
PMBFX38	4	50	25	34	73,53%
PMBFX187	4	50	5	13	38,46%
PMBFX187	4	50	9	26	34,62%
PMBFX187	4	50	14	35	40,00%
PMBFX187	4	50	7	12	58,33%
PMBFX147	4	50	0	82	0,00%
PMBFX147	4	50	0	94	0,00%
PMBFX147	4	50	0	77	0,00%
PMBFX147	4	50	0	86	0,00%
Controle	5	50	33	46	71,74%
Controle	5	50	45	61	73,77%
Controle	5	50	55	77	71,43%
Controle	5	50	43	62	69,35%
PMBCDC7	5	50	8	14	57,14%
PMBCDC7	5	50	6	17	35,29%
PMBCDC7	5	50	9	12	75,00%
PMBCDC7	5	50	5	10	50,00%
PMBMDF40	5	50	85	94	90,43%
PMBMDF40	5	50	73	87	83,91%
PMBMDF40	5	50	87	101	86,14%
PMBMDF40	5	50	85	97	87,63%
PMBMDF15	5	50	12	14	85,71%
PMBMDF15	5	50	12	15	80,00%
PMBMDF15	5	50	20	27	74,07%
PMBMDF15	5	50	20	24	83,33%
PMBMDF12	5	50	0	84	0,00%
PMBMDF12	5	50	0	82	0,00%
PMBMDF12	5	50	0	79	0,00%
PMBMDF12	5	50	0	91	0,00%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBMDF91	5	50	0	77	0,00%
PMBMDF91	5	50	0	84	0,00%
PMBMDF91	5	50	0	93	0,00%
PMBMDF91	5	50	0	76	0,00%
PMBMDF49	5	50	3	78	3,85%
PMBMDF49	5	50	2	64	3,13%
PMBMDF49	5	50	0	39	0,00%
PMBMDF49	5	50	1	41	2,44%
PMBMDF87	5	50	0	76	0,00%
PMBMDF87	5	50	0	82	0,00%
PMBMDF87	5	50	0	97	0,00%
PMBMDF87	5	50	0	74	0,00%
PMBMDF1	5	50	4	76	5,26%
PMBMDF1	5	50	5	78	6,41%
PMBMDF1	5	50	4	69	5,80%
PMBMDF1	5	50	0	28	0,00%
PMBMDF38	5	50	0	88	0,00%
PMBMDF38	5	50	1	104	0,96%
PMBMDF38	5	50	0	79	0,00%
PMBMDF38	5	50	0	91	0,00%
PMBCDC14	5	50	1	67	1,49%
PMBCDC14	5	50	0	64	0,00%
PMBCDC14	5	50	1	78	1,28%
PMBCDC14	5	50	0	55	0,00%
PMBCDC104	5	50	0	111	0,00%
PMBCDC104	5	50	0	94	0,00%
PMBCDC104	5	50	0	86	0,00%
PMBCDC104	5	50	0	77	0,00%
PMBMDF36	5	50	2	18	11,11%
PMBMDF36	5	50	2	24	8,33%
PMBMDF36	5	50	5	37	13,51%
PMBMDF36	5	50	2	14	14,29%
PMBCDC29	5	50	63	83	75,90%
PMBCDC29	5	50	34	54	62,96%
PMBCDC29	5	50	125	156	80,13%
PMBCDC29	5	50	55	71	77,46%
Controle	6	50	32	35	91,43%
Controle	6	50	43	45	95,56%
Controle	6	50	41	43	95,35%
Controle	6	50	16	16	100,00%
PMBFX2	6	50	26	50	52,00%
PMBFX2	6	50	17	31	54,84%
PMBFX2	6	50	15	30	50,00%
PMBFX2	6	50	14	23	60,87%
PMBFX28	6	50	0	32	0,00%
PMBFX28	6	50	0	30	0,00%
PMBFX28	6	50	0	43	0,00%
PMBFX28	6	50	0	29	0,00%
PMBFX56	6	50	0	75	0,00%
PMBFX56	6	50	0	73	0,00%
PMBFX56	6	50	0	68	0,00%
PMBFX56	6	50	0	81	0,00%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX64	6	50	24	28	85,71%
PMBFX64	6	50	21	24	87,50%
PMBFX64	6	50	30	33	90,91%
PMBFX64	6	50	19	21	90,48%
PMBMDF77	6	50	2	62	3,23%
PMBMDF77	6	50	1	74	1,35%
PMBMDF77	6	50	0	68	0,00%
PMBMDF77	6	50	1	48	2,08%
PMBFX81	6	50	26	50	52,00%
PMBFX81	6	50	17	31	54,84%
PMBFX81	6	50	3	6	50,00%
PMBFX81	6	50	11	13	84,62%
Controle	7	50	62	66	93,94%
Controle	7	50	64	72	88,89%
Controle	7	50	41	46	89,13%
Controle	7	50	76	87	87,36%
PMBFX178	7	50	22	25	88,00%
PMBFX178	7	50	32	34	94,12%
PMBFX178	7	50	22	24	91,67%
PMBFX178	7	50	26	29	89,66%
PMBFX136	7	50	38	40	95,00%
PMBFX136	7	50	47	52	90,38%
PMBFX136	7	50	35	38	92,11%
PMBFX136	7	50	44	47	93,62%
PMBFX109	7	50	59	67	88,06%
PMBFX109	7	50	30	36	83,33%
PMBFX109	7	50	46	53	86,79%
PMBFX109	7	50	51	58	87,93%
PMBFX158	7	50	33	36	91,67%
PMBFX158	7	50	33	38	86,84%
PMBFX158	7	50	21	22	95,45%
PMBFX158	7	50	22	25	88,00%
PMBFX152	7	50	53	58	91,38%
PMBFX152	7	50	60	64	93,75%
PMBFX152	7	50	55	58	94,83%
PMBFX152	7	50	53	57	92,98%
PMBFX41	7	50	65	73	89,04%
PMBFX41	7	50	69	77	89,61%
PMBFX41	7	50	63	71	88,73%
PMBFX41	7	50	74	81	91,36%
PMBFX125	7	50	33	38	86,84%
PMBFX125	7	50	39	43	90,70%
PMBFX125	7	50	41	44	93,18%
PMBFX125	7	50	37	41	90,24%
PMBFX144	7	50	46	51	90,20%
PMBFX144	7	50	68	78	87,18%
PMBFX144	7	50	28	29	96,55%
PMBFX144	7	50	34	38	89,47%
PMBFX55	7	50	2	34	5,88%
PMBFX55	7	50	5	45	11,11%
PMBFX55	7	50	3	41	7,32%
PMBFX55	7	50	2	37	5,41%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX82	7	50	38	46	82,61%
PMBFX82	7	50	49	57	85,96%
PMBFX82	7	50	35	43	81,40%
PMBFX82	7	50	37	45	82,22%
Controle	8	50	72	77	93,51%
Controle	8	50	65	71	91,55%
Controle	8	50	84	86	97,67%
Controle	8	50	92	98	93,88%
PMBCDC26	8	50	0	41	0,00%
PMBCDC26	8	50	0	58	0,00%
PMBCDC26	8	50	0	39	0,00%
PMBCDC26	8	50	0	48	0,00%
PMBCDC85	8	50	0	55	0,00%
PMBCDC85	8	50	0	63	0,00%
PMBCDC85	8	50	0	57	0,00%
PMBCDC85	8	50	0	51	0,00%
PMBCDC86	8	50	0	59	0,00%
PMBCDC86	8	50	0	102	0,00%
PMBCDC86	8	50	0	84	0,00%
PMBCDC86	8	50	0	86	0,00%
PMBCDC130	8	50	101	113	89,38%
PMBCDC130	8	50	98	104	94,23%
PMBCDC130	8	50	85	92	92,39%
PMBCDC130	8	50	96	107	89,72%
PMBFX45	8	50	0	87	0,00%
PMBFX45	8	50	0	58	0,00%
PMBFX45	8	50	0	94	0,00%
PMBFX45	8	50	0	108	0,00%
PMBFX78	8	50	35	42	83,33%
PMBFX78	8	50	48	55	87,27%
PMBFX78	8	50	45	58	77,59%
PMBFX78	8	50	51	61	83,61%
PMBFX52	8	50	0	63	0,00%
PMBFX52	8	50	0	55	0,00%
PMBFX52	8	50	0	74	0,00%
PMBFX52	8	50	0	51	0,00%
PMBFX90	8	50	0	117	0,00%
PMBFX90	8	50	0	110	0,00%
PMBFX90	8	50	0	121	0,00%
PMBFX90	8	50	0	113	0,00%
PMBFX92	8	50	0	58	0,00%
PMBFX92	8	50	0	62	0,00%
PMBFX92	8	50	0	75	0,00%
PMBFX92	8	50	0	54	0,00%
PMBFX197	8	50	41	49	83,67%
PMBFX197	8	50	61	68	89,71%
PMBFX197	8	50	48	59	81,36%
PMBFX197	8	50	51	57	89,47%
PMBFX3	8	50	71	78	91,03%
PMBFX3	8	50	65	72	90,28%
PMBFX3	8	50	60	67	89,55%
PMBFX3	8	50	71	81	87,65%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX25	8	50	51	58	87,93%
PMBFX25	8	50	55	61	90,16%
PMBFX25	8	50	51	54	94,44%
PMBFX25	8	50	63	72	87,50%
PMBFX77	8	50	65	68	95,59%
PMBFX77	8	50	76	84	90,48%
PMBFX77	8	50	67	74	90,54%
PMBFX77	8	50	78	85	91,76%
PMBFX167	8	50	56	58	96,55%
PMBFX167	8	50	45	47	95,74%
PMBFX167	8	50	50	52	96,15%
PMBFX167	8	50	52	55	94,55%
PMBFX156	8	50	72	77	93,51%
PMBFX156	8	50	76	84	90,48%
PMBFX156	8	50	64	71	90,14%
PMBFX156	8	50	74	78	94,87%
PMBCDC68	8	50	57	64	89,06%
PMBCDC68	8	50	60	66	90,91%
PMBCDC68	8	50	53	58	91,38%
PMBCDC68	8	50	71	77	92,21%
Controle	11	50	56	85	65,88%
Controle	11	50	34	49	69,39%
Controle	11	50	36	50	72,00%
Controle	11	50	53	76	69,74%
PMBFX2	11	50	33	63	52,38%
PMBFX2	11	50	18	42	42,86%
PMBFX2	11	50	30	60	50,00%
PMBFX2	11	50	32	67	47,76%
PMBFX28	11	50	0	78	0,00%
PMBFX28	11	50	0	95	0,00%
PMBFX28	11	50	0	65	0,00%
PMBFX28	11	50	0	74	0,00%
PMBFX64	11	50	22	35	62,86%
PMBFX64	11	50	40	62	64,52%
PMBFX64	11	50	56	86	65,12%
PMBFX64	11	50	26	41	63,41%
PMBFX81	11	50	27	63	42,86%
PMBFX81	11	50	28	58	48,28%
PMBFX81	11	50	20	45	44,44%
PMBFX81	11	50	41	96	42,71%
PMBMDF77	11	50	0	85	0,00%
PMBMDF77	11	50	0	80	0,00%
PMBMDF77	11	50	0	75	0,00%
PMBMDF77	11	50	0	87	0,00%
Controle	12	50	59	71	83,10%
Controle	12	50	47	56	83,93%
Controle	12	50	48	62	77,42%
Controle	12	50	67	76	88,16%
PMBFX32	12	50	0	75	0,00%
PMBFX32	12	50	0	84	0,00%
PMBFX32	12	50	0	57	0,00%
PMBFX32	12	50	0	79	0,00%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX63	12	50	5	45	11,11%
PMBFX63	12	50	11	61	18,03%
PMBFX63	12	50	9	64	14,06%
PMBFX63	12	50	7	55	12,73%
PMBFX116	12	50	0	94	0,00%
PMBFX116	12	50	0	72	0,00%
PMBFX116	12	50	0	78	0,00%
PMBFX116	12	50	0	53	0,00%
PMBFX127	12	50	0	77	0,00%
PMBFX127	12	50	0	45	0,00%
PMBFX127	12	50	0	68	0,00%
PMBFX127	12	50	0	71	0,00%
PMBFX146	12	50	45	65	69,23%
PMBFX146	12	50	31	47	65,96%
PMBFX146	12	50	35	49	71,43%
PMBFX146	12	50	36	54	66,67%
PMBFX147	12	50	0	75	0,00%
PMBFX147	12	50	0	63	0,00%
PMBFX147	12	50	0	67	0,00%
PMBFX147	12	50	0	71	0,00%
PMBFX155	12	50	53	56	94,64%
PMBFX155	12	50	61	65	93,85%
PMBFX155	12	50	52	56	92,86%
PMBFX155	12	50	61	70	87,14%
PMBFX187	12	50	67	101	66,34%
PMBFX187	12	50	51	80	63,75%
PMBFX187	12	50	44	67	65,67%
PMBFX187	12	50	54	85	63,53%
PMBFX189	12	50	43	86	50,00%
PMBFX189	12	50	52	97	53,61%
PMBFX189	12	50	35	73	47,95%
PMBFX189	12	50	41	84	48,81%
PMBCDC34	12	50	1	97	1,03%
PMBCDC34	12	50	2	106	1,89%
PMBCDC34	12	50	0	89	0,00%
PMBCDC34	12	50	2	110	1,82%
Controle	13	50	47	63	74,60%
Controle	13	50	33	45	73,33%
Controle	13	50	39	48	81,25%
Controle	13	50	43	61	70,49%
PMBFX45	13	50	0	57	0,00%
PMBFX45	13	50	0	62	0,00%
PMBFX45	13	50	0	77	0,00%
PMBFX45	13	50	0	51	0,00%
PMBFX52	13	50	0	66	0,00%
PMBFX52	13	50	0	84	0,00%
PMBFX52	13	50	0	58	0,00%
PMBFX52	13	50	0	65	0,00%
PMBFX56	13	50	0	65	0,00%
PMBFX56	13	50	0	81	0,00%
PMBFX56	13	50	0	61	0,00%
PMBFX56	13	50	0	73	0,00%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX78	13	50	52	74	70,27%
PMBFX78	13	50	59	88	67,05%
PMBFX78	13	50	45	67	67,16%
PMBFX78	13	50	66	93	70,97%
PMBFX90	13	50	0	93	0,00%
PMBFX90	13	50	0	84	0,00%
PMBFX90	13	50	0	65	0,00%
PMBFX90	13	50	0	74	0,00%
PMBFX92	13	50	0	56	0,00%
PMBFX92	13	50	0	72	0,00%
PMBFX92	13	50	0	66	0,00%
PMBFX92	13	50	0	98	0,00%
PMBFX197	13	50	76	99	76,77%
PMBFX197	13	50	54	76	71,05%
PMBFX197	13	50	47	63	74,60%
PMBFX197	13	50	63	86	73,26%
PMBCDC26	13	50	0	71	0,00%
PMBCDC26	13	50	0	87	0,00%
PMBCDC26	13	50	0	62	0,00%
PMBCDC26	13	50	0	53	0,00%
PMBCDC85	13	50	0	88	0,00%
PMBCDC85	13	50	0	81	0,00%
PMBCDC85	13	50	0	96	0,00%
PMBCDC85	13	50	0	83	0,00%
PMBCDC86	13	50	0	88	0,00%
PMBCDC86	13	50	0	81	0,00%
PMBCDC86	13	50	0	96	0,00%
PMBCDC86	13	50	0	83	0,00%
Controle	14	50	65	69	94,20%
Controle	14	50	78	83	93,98%
Controle	14	50	94	103	91,26%
Controle	14	50	64	67	95,52%
PMBFX55	14	50	0	98	0,00%
PMBFX55	14	50	0	81	0,00%
PMBFX55	14	50	0	56	0,00%
PMBFX55	14	50	0	75	0,00%
PMBFX82	14	50	60	78	76,92%
PMBFX82	14	50	61	81	75,31%
PMBFX82	14	50	53	67	79,10%
PMBFX82	14	50	71	95	74,74%
Controle	15	50	57	67	85,07%
Controle	15	50	67	75	89,33%
Controle	15	50	72	82	87,80%
Controle	15	50	50	57	87,72%
PMBCDC4	15	50	0	86	0,00%
PMBCDC4	15	50	0	54	0,00%
PMBCDC4	15	50	0	72	0,00%
PMBCDC4	15	50	0	85	0,00%
PMBCDC43	15	50	62	89	69,66%
PMBCDC43	15	50	74	102	72,55%
PMBCDC43	15	50	68	99	68,69%
PMBCDC43	15	50	61	87	70,11%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBCDC61	15	50	0	85	0,00%
PMBCDC61	15	50	0	68	0,00%
PMBCDC61	15	50	0	77	0,00%
PMBCDC61	15	50	1	83	1,20%
PMBCDC97	15	50	34	65	52,31%
PMBCDC97	15	50	50	88	56,82%
PMBCDC97	15	50	44	74	59,46%
PMBCDC97	15	50	38	67	56,72%
PMBCDC124	15	50	0	77	0,00%
PMBCDC124	15	50	0	86	0,00%
PMBCDC124	15	50	0	74	0,00%
PMBCDC124	15	50	0	98	0,00%
PMBMDF21	15	50	55	98	56,12%
PMBMDF21	15	50	38	68	55,88%
PMBMDF21	15	50	32	57	56,14%
PMBMDF21	15	50	48	82	58,54%
PMBMDF31	15	50	0	93	0,00%
PMBMDF31	15	50	0	67	0,00%
PMBMDF31	15	50	0	85	0,00%
PMBMDF31	15	50	0	81	0,00%
PMBMDF92	15	50	0	56	0,00%
PMBMDF92	15	50	1	109	0,92%
PMBMDF92	15	50	1	112	0,89%
PMBMDF92	15	50	0	87	0,00%
Controle	16	50	71	101	70,30%
Controle	16	50	53	75	70,67%
Controle	16	50	54	78	69,23%
Controle	16	50	67	94	71,28%
PMBCDC14	16	50	0	85	0,00%
PMBCDC14	16	50	0	73	0,00%
PMBCDC14	16	50	0	84	0,00%
PMBCDC14	16	50	0	76	0,00%
PMBCDC104	16	50	1	64	1,56%
PMBCDC104	16	50	2	78	2,56%
PMBCDC104	16	50	2	94	2,13%
PMBCDC104	16	50	1	70	1,43%
PMBMDF1	16	50	5	68	7,35%
PMBMDF1	16	50	7	78	8,97%
PMBMDF1	16	50	3	62	4,84%
PMBMDF1	16	50	8	96	8,33%
PMBMDF12	16	50	0	65	0,00%
PMBMDF12	16	50	0	38	0,00%
PMBMDF12	16	50	0	74	0,00%
PMBMDF12	16	50	0	54	0,00%
PMBMDF15	16	50	48	66	72,73%
PMBMDF15	16	50	62	87	71,26%
PMBMDF15	16	50	68	92	73,91%
PMBMDF15	16	50	52	75	69,33%
PMBMDF36	16	50	5	65	7,69%
PMBMDF36	16	50	8	88	9,09%
PMBMDF36	16	50	4	52	7,69%
PMBMDF36	16	50	9	86	10,47%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBMDF38	16	50	0	94	0,00%
PMBMDF38	16	50	0	56	0,00%
PMBMDF38	16	50	0	74	0,00%
PMBMDF38	16	50	0	69	0,00%
PMBMDF40	16	50	83	101	82,18%
PMBMDF40	16	50	78	97	80,41%
PMBMDF40	16	50	85	107	79,44%
PMBMDF40	16	50	74	87	85,06%
PMBMDF49	16	50	1	95	1,05%
PMBMDF49	16	50	0	77	0,00%
PMBMDF49	16	50	0	84	0,00%
PMBMDF49	16	50	0	72	0,00%
PMBMDF87	16	50	0	68	0,00%
PMBMDF87	16	50	0	84	0,00%
PMBMDF87	16	50	0	59	0,00%
PMBMDF87	16	50	0	75	0,00%
PMBMDF91	16	50	0	86	0,00%
PMBMDF91	16	50	0	81	0,00%
PMBMDF91	16	50	0	105	0,00%
PMBMDF91	16	50	0	79	0,00%
Controle	17	50	63	74	85,14%
Controle	17	50	74	89	83,15%
Controle	17	50	69	80	86,25%
Controle	17	50	61	71	85,92%
PMBCDC47	17	50	25	57	43,86%
PMBCDC47	17	50	28	63	44,44%
PMBCDC47	17	50	36	85	42,35%
PMBCDC47	17	50	29	63	46,03%
PMBCDC73	17	50	50	86	58,14%
PMBCDC73	17	50	36	56	64,29%
PMBCDC73	17	50	46	74	62,16%
PMBCDC73	17	50	42	67	62,69%
PMBCDC118	17	50	78	95	82,11%
PMBCDC118	17	50	55	71	77,46%
PMBCDC118	17	50	66	88	75,00%
PMBCDC118	17	50	75	95	78,95%
PMBCDC136	17	50	48	75	64,00%
PMBCDC136	17	50	61	86	70,93%
PMBCDC136	17	50	68	99	68,69%
PMBCDC136	17	50	48	67	71,64%
PMBMDF54	17	50	0	51	0,00%
PMBMDF54	17	50	0	43	0,00%
PMBMDF54	17	50	0	67	0,00%
PMBMDF54	17	50	0	52	0,00%
PMBMDF78	17	50	43	75	57,33%
PMBMDF78	17	50	41	68	60,29%
PMBMDF78	17	50	33	58	56,90%
PMBMDF78	17	50	41	71	57,75%
Controle	18	50	35	47	74,47%
Controle	18	50	44	67	65,67%
Controle	18	50	37	51	72,55%
Controle	18	50	55	72	76,39%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBCDC50	18	50	71	79	89,87%
PMBCDC50	18	50	58	68	85,29%
PMBCDC50	18	50	48	54	88,89%
PMBCDC50	18	50	77	83	92,77%
PMBCDC116	18	50	58	68	85,29%
PMBCDC116	18	50	67	75	89,33%
PMBCDC116	18	50	42	49	85,71%
PMBCDC116	18	50	55	62	88,71%
PMBMDF71	18	50	0	68	0,00%
PMBMDF71	18	50	0	55	0,00%
PMBMDF71	18	50	0	49	0,00%
PMBMDF71	18	50	0	58	0,00%
PMBMDF89	18	50	2	78	2,56%
PMBMDF89	18	50	0	71	0,00%
PMBMDF89	18	50	1	65	1,54%
PMBMDF89	18	50	2	67	2,99%
Controle	19	12,5	60	80	75,00%
Controle	19	12,5	51	72	70,83%
Controle	19	12,5	43	55	78,18%
Controle	19	12,5	46	62	74,19%
PMBFX28	19	12,5	0	68	0,00%
PMBFX28	19	12,5	0	87	0,00%
PMBFX28	19	12,5	0	56	0,00%
PMBFX28	19	12,5	0	84	0,00%
PMBFX55	19	12,5	24	75	32,00%
PMBFX55	19	12,5	16	49	32,65%
PMBFX55	19	12,5	20	59	33,90%
PMBFX55	19	12,5	28	70	40,00%
PMBFX56	19	12,5	0	101	0,00%
PMBFX56	19	12,5	0	87	0,00%
PMBFX56	19	12,5	0	64	0,00%
PMBFX56	19	12,5	0	77	0,00%
PMBFX63	19	12,5	46	76	60,53%
PMBFX63	19	12,5	52	84	61,90%
PMBFX63	19	12,5	54	88	61,36%
PMBFX63	19	12,5	45	65	69,23%
PMBFX116	19	12,5	60	93	64,52%
PMBFX116	19	12,5	53	75	70,67%
PMBFX116	19	12,5	47	68	69,12%
PMBFX116	19	12,5	57	87	65,52%
PMBCDC61	19	12,5	29	67	43,28%
PMBCDC61	19	12,5	29	59	49,15%
PMBCDC61	19	12,5	32	69	46,38%
PMBCDC61	19	12,5	37	87	42,53%
PMBCDC124	19	12,5	28	69	40,58%
PMBCDC124	19	12,5	26	77	33,77%
PMBCDC124	19	12,5	34	95	35,79%
PMBCDC124	19	12,5	36	76	47,37%
PMBMDF12	19	12,5	0	72	0,00%
PMBMDF12	19	12,5	0	71	0,00%
PMBMDF12	19	12,5	0	48	0,00%
PMBMDF12	19	12,5	0	68	0,00%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBMDF38	19	12,5	56	98	57,14%
PMBMDF38	19	12,5	65	102	63,73%
PMBMDF38	19	12,5	50	81	61,73%
PMBMDF38	19	12,5	73	114	64,04%
PMBMDF54	19	12,5	41	67	61,19%
PMBMDF54	19	12,5	49	74	66,22%
PMBMDF54	19	12,5	36	52	69,23%
PMBMDF54	19	12,5	44	67	65,67%
PMBMDF77	19	12,5	0	86	0,00%
PMBMDF77	19	12,5	0	57	0,00%
PMBMDF77	19	12,5	0	84	0,00%
PMBMDF77	19	12,5	0	95	0,00%
PMBMDF87	19	12,5	0	66	0,00%
PMBMDF87	19	12,5	0	74	0,00%
PMBMDF87	19	12,5	0	52	0,00%
PMBMDF87	19	12,5	0	78	0,00%
PMBMDF91	19	12,5	41	64	64,06%
PMBMDF91	19	12,5	37	59	62,71%
PMBMDF91	19	12,5	59	90	65,56%
PMBMDF91	19	12,5	48	75	64,00%
PMBMDF92	19	12,5	0	95	0,00%
PMBMDF92	19	12,5	0	110	0,00%
PMBMDF92	19	12,5	0	76	0,00%
PMBMDF92	19	12,5	0	99	0,00%
Controle	20	12,5	87	101	86,14%
Controle	20	12,5	58	68	85,29%
Controle	20	12,5	65	73	89,04%
Controle	20	12,5	79	91	86,81%
PMBFX45	20	12,5	0	98	0,00%
PMBFX45	20	12,5	0	76	0,00%
PMBFX45	20	12,5	0	84	0,00%
PMBFX45	20	12,5	0	95	0,00%
PMBFX90	20	12,5	41	85	48,24%
PMBFX90	20	12,5	35	79	44,30%
PMBFX90	20	12,5	27	57	47,37%
PMBFX90	20	12,5	41	85	48,24%
PMBFX92	20	12,5	0	110	0,00%
PMBFX92	20	12,5	0	73	0,00%
PMBFX92	20	12,5	0	84	0,00%
PMBFX92	20	12,5	0	97	0,00%
PMBFX127	20	12,5	4	51	7,84%
PMBFX127	20	12,5	9	68	13,24%
PMBFX127	20	12,5	12	73	16,44%
PMBFX127	20	12,5	8	61	13,11%
PMBCDC14	20	12,5	0	77	0,00%
PMBCDC14	20	12,5	0	89	0,00%
PMBCDC14	20	12,5	0	68	0,00%
PMBCDC14	20	12,5	0	75	0,00%
PMBCDC26	20	12,5	0	91	0,00%
PMBCDC26	20	12,5	0	86	0,00%
PMBCDC26	20	12,5	0	74	0,00%
PMBCDC26	20	12,5	0	98	0,00%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBCDC85	20	12,5	47	95	49,47%
PMBCDC85	20	12,5	38	77	49,35%
PMBCDC85	20	12,5	33	64	51,56%
PMBCDC85	20	12,5	38	68	55,88%
PMBCDC86	20	12,5	0	53	0,00%
PMBCDC86	20	12,5	0	64	0,00%
PMBCDC86	20	12,5	0	72	0,00%
PMBCDC86	20	12,5	0	57	0,00%
PMBMDF36	20	12,5	3	96	3,13%
PMBMDF36	20	12,5	0	58	0,00%
PMBMDF36	20	12,5	0	67	0,00%
PMBMDF36	20	12,5	0	84	0,00%
PMBMDF49	20	12,5	0	92	0,00%
PMBMDF49	20	12,5	0	56	0,00%
PMBMDF49	20	12,5	0	81	0,00%
PMBMDF49	20	12,5	0	74	0,00%
PMBMDF89	20	12,5	13	103	12,62%
PMBMDF89	20	12,5	9	96	9,38%
PMBMDF89	20	12,5	7	87	8,05%
PMBMDF89	20	12,5	15	107	14,02%
Controle	21	12,5	73	82	89,02%
Controle	21	12,5	71	77	92,21%
Controle	21	12,5	99	106	93,40%
Controle	21	12,5	85	88	96,59%
PMBCDC4	21	12,5	77	90	85,56%
PMBCDC4	21	12,5	87	97	89,69%
PMBCDC4	21	12,5	65	74	87,84%
PMBCDC4	21	12,5	86	101	85,15%
PMBCDC34	21	12,5	91	102	89,22%
PMBCDC34	21	12,5	90	97	92,78%
PMBCDC34	21	12,5	84	91	92,31%
PMBCDC34	21	12,5	92	103	89,32%
PMBCDC61	21	12,5	43	91	47,25%
PMBCDC61	21	12,5	49	114	42,98%
PMBCDC61	21	12,5	48	85	56,47%
PMBCDC61	21	12,5	44	102	43,14%
PMBCDC104	21	12,5	83	95	87,37%
PMBCDC104	21	12,5	86	91	94,51%
PMBCDC104	21	12,5	77	86	89,53%
PMBCDC104	21	12,5	91	104	87,50%
PMBCDC124	21	12,5	38	68	55,88%
PMBCDC124	21	12,5	42	84	50,00%
PMBCDC124	21	12,5	45	82	54,88%
PMBCDC124	21	12,5	39	77	50,65%
PMBFX32	21	12,5	57	63	90,48%
PMBFX32	21	12,5	50	58	86,21%
PMBFX32	21	12,5	51	57	89,47%
PMBFX32	21	12,5	58	64	90,63%
PMBFX28	21	12,5	0	89	0,00%
PMBFX28	21	12,5	0	57	0,00%
PMBFX28	21	12,5	0	76	0,00%
PMBFX28	21	12,5	0	84	0,00%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX55	21	12,5	24	46	52,17%
PMBFX55	21	12,5	29	59	49,15%
PMBFX55	21	12,5	24	44	54,55%
PMBFX55	21	12,5	27	52	51,92%
PMBFX56	21	12,5	0	64	0,00%
PMBFX56	21	12,5	0	55	0,00%
PMBFX56	21	12,5	0	68	0,00%
PMBFX56	21	12,5	0	57	0,00%
PMBFX63	21	12,5	63	76	82,89%
PMBFX63	21	12,5	73	84	86,90%
PMBFX63	21	12,5	62	78	79,49%
PMBFX63	21	12,5	56	68	82,35%
PMBFX116	21	12,5	53	69	76,81%
PMBFX116	21	12,5	52	74	70,27%
PMBFX116	21	12,5	43	58	74,14%
PMBFX116	21	12,5	50	65	76,92%
PMBFX147	21	12,5	48	55	87,27%
PMBFX147	21	12,5	61	68	89,71%
PMBFX147	21	12,5	52	59	88,14%
PMBFX147	21	12,5	58	64	90,63%
PMBMDF1	21	12,5	78	85	91,76%
PMBMDF1	21	12,5	97	114	85,09%
PMBMDF1	21	12,5	87	99	87,88%
PMBMDF1	21	12,5	92	101	91,09%
PMBMDF12	21	12,5	0	65	0,00%
PMBMDF12	21	12,5	0	89	0,00%
PMBMDF12	21	12,5	0	68	0,00%
PMBMDF12	21	12,5	0	74	0,00%
PMBMDF31	21	12,5	39	42	92,86%
PMBMDF31	21	12,5	49	55	89,09%
PMBMDF31	21	12,5	58	67	86,57%
PMBMDF31	21	12,5	54	59	91,53%
PMBMDF38	21	12,5	84	103	81,55%
PMBMDF38	21	12,5	85	109	77,98%
PMBMDF38	21	12,5	81	95	85,26%
PMBMDF38	21	12,5	95	113	84,07%
PMBMDF54	21	12,5	55	65	84,62%
PMBMDF54	21	12,5	68	79	86,08%
PMBMDF54	21	12,5	47	58	81,03%
PMBMDF54	21	12,5	55	62	88,71%
PMBMDF71	21	12,5	34	37	91,89%
PMBMDF71	21	12,5	44	56	78,57%
PMBMDF71	21	12,5	35	38	92,11%
PMBMDF71	21	12,5	43	47	91,49%
PMBMDF77	21	12,5	0	74	0,00%
PMBMDF77	21	12,5	0	70	0,00%
PMBMDF77	21	12,5	0	86	0,00%
PMBMDF77	21	12,5	0	66	0,00%
PMBMDF87	21	12,5	0	104	0,00%
PMBMDF87	21	12,5	0	87	0,00%
PMBMDF87	21	12,5	0	109	0,00%
PMBMDF87	21	12,5	0	99	0,00%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBMDF91	21	12,5	80	96	83,33%
PMBMDF91	21	12,5	86	101	85,15%
PMBMDF91	21	12,5	75	94	79,79%
PMBMDF91	21	12,5	95	114	83,33%
PMBMDF92	21	12,5	0	101	0,00%
PMBMDF92	21	12,5	0	94	0,00%
PMBMDF92	21	12,5	0	73	0,00%
PMBMDF92	21	12,5	0	89	0,00%
Controle	22	12,5	25	41	60,98%
Controle	22	12,5	35	49	71,43%
Controle	22	12,5	37	55	67,27%
Controle	22	12,5	29	44	65,91%
PMBCDC14	22	12,5	1	51	1,96%
PMBCDC14	22	12,5	2	87	2,30%
PMBCDC14	22	12,5	3	88	3,41%
PMBCDC14	22	12,5	1	69	1,45%
PMBCDC26	22	12,5	0	53	0,00%
PMBCDC26	22	12,5	0	45	0,00%
PMBCDC26	22	12,5	0	50	0,00%
PMBCDC26	22	12,5	0	44	0,00%
PMBCDC85	22	12,5	19	49	38,78%
PMBCDC85	22	12,5	23	53	43,40%
PMBCDC85	22	12,5	26	64	40,63%
PMBCDC85	22	12,5	21	45	46,67%
PMBFX45	22	12,5	0	105	0,00%
PMBFX45	22	12,5	0	89	0,00%
PMBFX45	22	12,5	0	97	0,00%
PMBFX45	22	12,5	0	92	0,00%
PMBFX52	22	12,5	29	46	63,04%
PMBFX52	22	12,5	36	59	61,02%
PMBFX52	22	12,5	38	55	69,09%
PMBFX52	22	12,5	35	53	66,04%
PMBFX90	22	12,5	18	38	47,37%
PMBFX90	22	12,5	23	47	48,94%
PMBFX90	22	12,5	20	44	45,45%
PMBFX90	22	12,5	21	51	41,18%
PMBFX92	22	12,5	0	51	0,00%
PMBFX92	22	12,5	0	47	0,00%
PMBFX92	22	12,5	0	32	0,00%
PMBFX92	22	12,5	0	55	0,00%
PMBFX127	22	12,5	2	42	4,76%
PMBFX127	22	12,5	3	48	6,25%
PMBFX127	22	12,5	5	53	9,43%
PMBFX127	22	12,5	6	47	12,77%
PMBCDC86	22	12,5	0	55	0,00%
PMBCDC86	22	12,5	0	32	0,00%
PMBCDC86	22	12,5	0	64	0,00%
PMBCDC86	22	12,5	0	56	0,00%
PMBMDF36	22	12,5	1	35	2,86%
PMBMDF36	22	12,5	2	42	4,76%
PMBMDF36	22	12,5	3	54	5,56%
PMBMDF36	22	12,5	1	44	2,27%

(continuação Apêndice B)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBMDF49	22	12,5	0	55	0,00%
PMBMDF49	22	12,5	0	62	0,00%
PMBMDF49	22	12,5	0	58	0,00%
PMBMDF49	22	12,5	0	47	0,00%
PMBMDF89	22	12,5	2	45	4,44%
PMBMDF89	22	12,5	3	48	6,25%
PMBMDF89	22	12,5	4	69	5,80%
PMBMDF89	22	12,5	2	57	3,51%

Apêndice C. Dados de contagem de conídios e porcentagens de germinação dos campos visualizados ao microscópio óptico (objetiva 10X) nos testes de germinação de conídios da variedade fisiológica de *M. ulei* PMB 28

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
Controle	1	50	48	61	78,69%
Controle	1	50	47	49	95,92%
Controle	1	50	38	50	76,00%
Controle	1	50	49	60	81,67%
PMBMDF28	1	50	23	27	85,19%
PMBMDF28	1	50	38	46	82,61%
PMBMDF28	1	50	25	30	83,33%
PMBMDF28	1	50	31	37	83,78%
PMBCDC50	1	50	28	29	96,55%
PMBCDC50	1	50	53	56	94,64%
PMBCDC50	1	50	25	26	96,15%
PMBCDC50	1	50	39	41	95,12%
PMBCDC116	1	50	42	44	95,45%
PMBCDC116	1	50	39	41	95,12%
PMBCDC116	1	50	36	37	97,30%
PMBCDC116	1	50	43	46	93,48%
PMBCDC118	1	50	17	23	73,91%
PMBCDC118	1	50	23	30	76,67%
PMBCDC118	1	50	16	20	80,00%
PMBCDC118	1	50	20	26	76,92%
PMBCDC139	1	50	33	41	80,49%
PMBCDC139	1	50	61	78	78,21%
PMBCDC139	1	50	57	70	81,43%
PMBCDC139	1	50	55	66	83,33%
PMBCDC115	1	50	34	47	72,34%
PMBCDC115	1	50	43	53	81,13%
PMBCDC115	1	50	26	33	78,79%
PMBCDC115	1	50	30	39	76,92%
PMBCDC74	1	50	18	24	75,00%
PMBCDC74	1	50	17	25	68,00%
PMBCDC74	1	50	47	50	94,00%
PMBCDC74	1	50	37	53	69,81%
PMBMDF78	1	50	14	25	56,00%
PMBMDF78	1	50	30	56	53,57%
PMBMDF78	1	50	31	45	68,89%
PMBMDF78	1	50	25	58	43,10%
PMBCDC35	1	50	43	59	72,88%
PMBCDC35	1	50	28	43	65,12%
PMBCDC35	1	50	19	29	65,52%
PMBCDC35	1	50	16	20	80,00%
PMBCDC4	1	50	11	53	20,75%
PMBCDC4	1	50	7	46	15,22%
PMBCDC4	1	50	4	31	12,90%
PMBCDC4	1	50	3	24	12,50%
PMBCDC43	1	50	27	42	64,29%
PMBCDC43	1	50	47	66	71,21%
PMBCDC43	1	50	90	122	73,77%
PMBCDC43	1	50	30	53	56,60%
PMBCDC124	1	50	0	29	0,00%
PMBCDC124	1	50	0	33	0,00%
PMBCDC124	1	50	6	38	15,79%
PMBCDC124	1	50	0	36	0,00%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
Controle	2	50	59	76	77,63%
Controle	2	50	59	81	72,84%
Controle	2	50	70	86	81,40%
Controle	2	50	53	69	76,81%
PMBMDF21	2	50	25	34	73,53%
PMBMDF21	2	50	20	28	71,43%
PMBMDF21	2	50	28	39	71,79%
PMBMDF21	2	50	29	39	74,36%
PMBMDF83	2	50	44	51	86,27%
PMBMDF83	2	50	43	52	82,69%
PMBMDF83	2	50	34	47	72,34%
PMBMDF83	2	50	37	46	80,43%
PMBCDC61	2	50	0	52	0,00%
PMBCDC61	2	50	0	88	0,00%
PMBCDC61	2	50	0	35	0,00%
PMBCDC61	2	50	0	49	0,00%
PMBMDF31	2	50	3	114	2,63%
PMBMDF31	2	50	0	66	0,00%
PMBMDF31	2	50	6	85	7,06%
PMBMDF31	2	50	0	69	0,00%
PMBMDF54	2	50	0	77	0,00%
PMBMDF54	2	50	0	83	0,00%
PMBMDF54	2	50	0	79	0,00%
PMBMDF54	2	50	0	88	0,00%
PMBCDC70	2	50	41	54	75,93%
PMBCDC70	2	50	26	36	72,22%
PMBCDC70	2	50	25	37	67,57%
PMBCDC70	2	50	38	51	74,51%
PMBCDC63	2	50	35	43	81,40%
PMBCDC63	2	50	26	33	78,79%
PMBCDC63	2	50	28	36	77,78%
PMBCDC63	2	50	16	20	80,00%
PMBCDC97	2	50	39	56	69,64%
PMBCDC97	2	50	19	28	67,86%
PMBCDC97	2	50	15	22	68,18%
PMBCDC97	2	50	36	51	70,59%
PMBMDF73	2	50	29	38	76,32%
PMBMDF73	2	50	41	51	80,39%
PMBMDF73	2	50	39	50	78,00%
PMBMDF73	2	50	26	32	81,25%
PMBMDF48	2	50	56	72	77,78%
PMBMDF48	2	50	43	60	71,67%
PMBMDF48	2	50	48	57	84,21%
PMBMDF48	2	50	32	43	74,42%
PMBCDC47	2	50	20	35	57,14%
PMBCDC47	2	50	21	37	56,76%
PMBCDC47	2	50	20	38	52,63%
PMBCDC47	2	50	19	38	50,00%
PMBCDC136	2	50	27	44	61,36%
PMBCDC136	2	50	21	31	67,74%
PMBCDC136	2	50	22	34	64,71%
PMBCDC136	2	50	25	41	60,98%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMB CDC123	2	50	49	61	80,33%
PMB CDC123	2	50	35	43	81,40%
PMB CDC123	2	50	34	46	73,91%
PMB CDC123	2	50	23	29	79,31%
Controle	3	50	62	81	76,54%
Controle	3	50	64	86	74,42%
Controle	3	50	61	78	78,21%
Controle	3	50	42	97	43,30%
PMB FX146	3	50	47	89	52,81%
PMB FX146	3	50	57	118	48,31%
PMB FX146	3	50	40	88	45,45%
PMB FX146	3	50	46	97	47,42%
PMB FX127	3	50	0	104	0,00%
PMB FX127	3	50	0	92	0,00%
PMB FX127	3	50	0	94	0,00%
PMB FX127	3	50	0	112	0,00%
PMB FX187	3	50	40	101	39,60%
PMB FX187	3	50	68	140	48,57%
PMB FX187	3	50	41	91	45,05%
PMB FX187	3	50	51	110	46,36%
PMB FX189	3	50	41	105	39,05%
PMB FX189	3	50	34	84	40,48%
PMB FX189	3	50	53	117	45,30%
PMB FX189	3	50	42	98	42,86%
PMB MDF40	3	50	75	93	80,65%
PMB MDF40	3	50	90	132	68,18%
PMB MDF40	3	50	88	116	75,86%
PMB MDF40	3	50	84	112	75,00%
PMB FX63	3	50	13	123	10,57%
PMB FX63	3	50	17	120	14,17%
PMB FX63	3	50	17	108	15,74%
PMB FX63	3	50	12	119	10,08%
PMB FX182	3	50	78	108	72,22%
PMB FX182	3	50	80	110	72,73%
PMB FX182	3	50	105	125	84,00%
PMB FX182	3	50	81	117	69,23%
PMB FX175	3	50	97	131	74,05%
PMB FX175	3	50	79	99	79,80%
PMB FX175	3	50	72	114	63,16%
PMB FX175	3	50	58	80	72,50%
PMB FX116	3	50	0	84	0,00%
PMB FX116	3	50	0	68	0,00%
PMB FX116	3	50	0	77	0,00%
PMB FX116	3	50	0	92	0,00%
PMB FX147	3	50	0	91	0,00%
PMB FX147	3	50	0	103	0,00%
PMB FX147	3	50	0	78	0,00%
PMB FX147	3	50	0	93	0,00%
PMB FX155	3	50	85	104	81,73%
PMB FX155	3	50	90	117	76,92%
PMB FX155	3	50	76	90	84,44%
PMB FX155	3	50	94	106	88,68%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX32	3	50	0	67	0,00%
PMBFX32	3	50	0	73	0,00%
PMBFX32	3	50	0	80	0,00%
PMBFX32	3	50	0	75	0,00%
PMBCDC34	3	50	0	49	0,00%
PMBCDC34	3	50	0	56	0,00%
PMBCDC34	3	50	0	52	0,00%
PMBCDC34	3	50	0	61	0,00%
PMBFX38	3	50	57	88	64,77%
PMBFX38	3	50	72	102	70,59%
PMBFX38	3	50	70	110	63,64%
PMBFX38	3	50	61	93	65,59%
PMBFX13	3	50	49	67	73,13%
PMBFX13	3	50	73	108	67,59%
PMBFX13	3	50	78	126	61,90%
PMBFX13	3	50	50	74	67,57%
Controle	4	50	43	46	93,48%
Controle	4	50	26	29	89,66%
Controle	4	50	44	46	95,65%
Controle	4	50	39	42	92,86%
PMBMDF87	4	50	0	87	0,00%
PMBMDF87	4	50	0	112	0,00%
PMBMDF87	4	50	0	89	0,00%
PMBMDF87	4	50	0	94	0,00%
PMBMDF15	4	50	70	71	98,59%
PMBMDF15	4	50	47	50	94,00%
PMBMDF15	4	50	67	72	93,06%
PMBMDF15	4	50	45	47	95,74%
PMBFX70	4	50	18	19	94,74%
PMBFX70	4	50	19	20	95,00%
PMBFX70	4	50	22	23	95,65%
PMBFX70	4	50	17	18	94,44%
PMBCDC29	4	50	42	47	89,36%
PMBCDC29	4	50	30	32	93,75%
PMBCDC29	4	50	52	53	98,11%
PMBCDC29	4	50	23	28	82,14%
PMBMDF49	4	50	0	98	0,00%
PMBMDF49	4	50	0	102	0,00%
PMBMDF49	4	50	0	79	0,00%
PMBMDF49	4	50	0	84	0,00%
PMBCDC7	4	50	19	25	76,00%
PMBCDC7	4	50	87	104	83,65%
PMBCDC7	4	50	78	94	82,98%
PMBCDC7	4	50	43	62	69,35%
PMBMDF36	4	50	6	36	16,67%
PMBMDF36	4	50	5	34	14,71%
PMBMDF36	4	50	2	17	11,76%
PMBMDF36	4	50	6	48	12,50%
PMBCDC104	4	50	0	104	0,00%
PMBCDC104	4	50	0	98	0,00%
PMBCDC104	4	50	0	112	0,00%
PMBCDC104	4	50	0	89	0,00%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBMDF12	4	50	0	82	0,00%
PMBMDF12	4	50	0	59	0,00%
PMBMDF12	4	50	0	63	0,00%
PMBMDF12	4	50	0	68	0,00%
PMBMDF91	4	50	0	106	0,00%
PMBMDF91	4	50	0	114	0,00%
PMBMDF91	4	50	0	92	0,00%
PMBMDF91	4	50	0	78	0,00%
Controle	5	50	34	41	82,93%
Controle	5	50	35	41	85,37%
Controle	5	50	33	42	78,57%
Controle	5	50	39	46	84,78%
PMBMDF38	5	50	0	82	0,00%
PMBMDF38	5	50	0	96	0,00%
PMBMDF38	5	50	1	107	0,93%
PMBMDF38	5	50	0	76	0,00%
PMBCDC14	5	50	0	78	0,00%
PMBCDC14	5	50	1	97	1,03%
PMBCDC14	5	50	2	112	1,79%
PMBCDC14	5	50	0	84	0,00%
Controle	6	50	40	47	85,11%
Controle	6	50	42	51	82,35%
Controle	6	50	48	56	85,71%
Controle	6	50	46	52	88,46%
PMBCDC85	6	50	0	78	0,00%
PMBCDC85	6	50	0	64	0,00%
PMBCDC85	6	50	0	72	0,00%
PMBCDC85	6	50	0	63	0,00%
PMBFX2	6	50	24	30	80,00%
PMBFX2	6	50	16	20	80,00%
PMBFX2	6	50	15	18	83,33%
PMBFX2	6	50	15	21	71,43%
PMBFX28	6	50	0	72	0,00%
PMBFX28	6	50	0	61	0,00%
PMBFX28	6	50	0	80	0,00%
PMBFX28	6	50	0	53	0,00%
PMBFX56	6	50	0	75	0,00%
PMBFX56	6	50	0	30	0,00%
PMBFX56	6	50	0	43	0,00%
PMBFX56	6	50	0	29	0,00%
PMBFX64	6	50	18	21	85,71%
PMBFX64	6	50	27	32	84,38%
PMBFX64	6	50	38	48	79,17%
PMBFX64	6	50	20	24	83,33%
PMBFX81	6	50	13	28	46,43%
PMBFX81	6	50	9	20	45,00%
PMBFX81	6	50	14	27	51,85%
PMBFX81	6	50	13	24	54,17%
Controle	7	50	59	75	78,67%
Controle	7	50	68	83	81,93%
Controle	7	50	53	66	80,30%
Controle	7	50	56	72	77,78%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX178	7	50	65	85	76,47%
PMBFX178	7	50	74	92	80,43%
PMBFX178	7	50	61	81	75,31%
PMBFX178	7	50	69	96	71,88%
PMBFX136	7	50	67	84	79,76%
PMBFX136	7	50	75	96	78,13%
PMBFX136	7	50	56	70	80,00%
PMBFX136	7	50	68	84	80,95%
PMBFX109	7	50	39	50	78,00%
PMBFX109	7	50	44	59	74,58%
PMBFX109	7	50	33	45	73,33%
PMBFX109	7	50	42	53	79,25%
PMBFX158	7	50	74	91	81,32%
PMBFX158	7	50	65	79	82,28%
PMBFX158	7	50	67	85	78,82%
PMBFX158	7	50	71	88	80,68%
PMBFX152	7	50	41	56	73,21%
PMBFX152	7	50	49	62	79,03%
PMBFX152	7	50	42	57	73,68%
PMBFX152	7	50	35	45	77,78%
PMBFX41	7	50	75	96	78,13%
PMBFX41	7	50	98	116	84,48%
PMBFX41	7	50	78	95	82,11%
PMBFX41	7	50	81	101	80,20%
PMBFX125	7	50	64	81	79,01%
PMBFX125	7	50	78	97	80,41%
PMBFX125	7	50	61	79	77,22%
PMBFX125	7	50	72	88	81,82%
PMBFX144	7	50	68	87	78,16%
PMBFX144	7	50	81	101	80,20%
PMBFX144	7	50	71	91	78,02%
PMBFX144	7	50	73	87	83,91%
PMBFX55	7	50	1	102	0,98%
PMBFX55	7	50	0	95	0,00%
PMBFX55	7	50	2	107	1,87%
PMBFX55	7	50	1	105	0,95%
PMBFX82	7	50	79	98	80,61%
PMBFX82	7	50	67	86	77,91%
PMBFX82	7	50	77	105	73,33%
PMBFX82	7	50	69	87	79,31%
Controle	8	50	69	80	86,25%
Controle	8	50	74	88	84,09%
Controle	8	50	89	104	85,58%
Controle	8	50	86	97	88,66%
PMBMDF1	8	50	6	71	8,45%
PMBMDF1	8	50	6	75	8,00%
PMBMDF1	8	50	8	85	9,41%
PMBMDF1	8	50	6	72	8,33%
PMBMDF71	8	50	12	100	12,00%
PMBMDF71	8	50	11	87	12,64%
PMBMDF71	8	50	18	114	15,79%
PMBMDF71	8	50	12	101	11,88%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBMDF77	8	50	0	97	0,00%
PMBMDF77	8	50	0	110	0,00%
PMBMDF77	8	50	0	82	0,00%
PMBMDF77	8	50	0	89	0,00%
PMBMDF89	8	50	6	67	8,96%
PMBMDF89	8	50	6	81	7,41%
PMBMDF89	8	50	4	88	4,55%
PMBMDF89	8	50	2	69	2,90%
PMBMDF92	8	50	7	89	7,87%
PMBMDF92	8	50	8	112	7,14%
PMBMDF92	8	50	5	75	6,67%
PMBMDF92	8	50	5	86	5,81%
PMBCDC26	8	50	0	85	0,00%
PMBCDC26	8	50	0	78	0,00%
PMBCDC26	8	50	0	69	0,00%
PMBCDC26	8	50	0	81	0,00%
PMBCDC86	8	50	0	114	0,00%
PMBCDC86	8	50	0	109	0,00%
PMBCDC86	8	50	0	121	0,00%
PMBCDC86	8	50	0	101	0,00%
PMBCDC130	8	50	63	74	85,14%
PMBCDC130	8	50	75	89	84,27%
PMBCDC130	8	50	69	86	80,23%
PMBCDC130	8	50	59	75	78,67%
PMBFX45	8	50	0	48	0,00%
PMBFX45	8	50	0	54	0,00%
PMBFX45	8	50	0	63	0,00%
PMBFX45	8	50	0	59	0,00%
PMBFX52	8	50	0	66	0,00%
PMBFX52	8	50	0	74	0,00%
PMBFX52	8	50	0	65	0,00%
PMBFX52	8	50	0	87	0,00%
PMBFX78	8	50	82	93	88,17%
PMBFX78	8	50	69	77	89,61%
PMBFX78	8	50	81	94	86,17%
PMBFX78	8	50	90	102	88,24%
PMBFX90	8	50	0	80	0,00%
PMBFX90	8	50	0	74	0,00%
PMBFX90	8	50	0	87	0,00%
PMBFX90	8	50	0	75	0,00%
PMBFX92	8	50	0	104	0,00%
PMBFX92	8	50	0	73	0,00%
PMBFX92	8	50	0	78	0,00%
PMBFX92	8	50	0	97	0,00%
PMBFX197	8	50	52	64	81,25%
PMBFX197	8	50	64	75	85,33%
PMBFX197	8	50	63	77	81,82%
PMBFX197	8	50	68	80	85,00%
PMBFX3	8	50	56	67	83,58%
PMBFX3	8	50	63	71	88,73%
PMBFX3	8	50	49	58	84,48%
PMBFX3	8	50	53	61	86,89%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX25	8	50	45	54	83,33%
PMBFX25	8	50	61	74	82,43%
PMBFX25	8	50	56	68	82,35%
PMBFX25	8	50	62	71	87,32%
PMBFX77	8	50	62	76	81,58%
PMBFX77	8	50	46	51	90,20%
PMBFX77	8	50	41	45	91,11%
PMBFX77	8	50	52	58	89,66%
PMBFX167	8	50	47	52	90,38%
PMBFX167	8	50	62	68	91,18%
PMBFX167	8	50	57	66	86,36%
PMBFX167	8	50	51	57	89,47%
PMBFX156	8	50	54	63	85,71%
PMBFX156	8	50	71	78	91,03%
PMBFX156	8	50	52	57	91,23%
PMBFX156	8	50	64	69	92,75%
PMBCDC68	8	50	44	55	80,00%
PMBCDC68	8	50	62	72	86,11%
PMBCDC68	8	50	63	77	81,82%
PMBCDC68	8	50	52	59	88,14%
Controle	9	12,5	59	75	78,67%
Controle	9	12,5	68	83	81,93%
Controle	9	12,5	53	66	80,30%
Controle	9	12,5	58	72	80,56%
PMBFX32	9	12,5	63	80	78,75%
PMBFX32	9	12,5	66	89	74,16%
PMBFX32	9	12,5	79	97	81,44%
PMBFX32	9	12,5	80	95	84,21%
PMBFX63	9	12,5	55	75	73,33%
PMBFX63	9	12,5	56	74	75,68%
PMBFX63	9	12,5	45	61	73,77%
PMBFX63	9	12,5	58	84	69,05%
PMBFX116	9	12,5	30	47	63,83%
PMBFX116	9	12,5	32	53	60,38%
PMBFX116	9	12,5	49	78	62,82%
PMBFX116	9	12,5	35	51	68,63%
PMBFX127	9	12,5	13	89	14,61%
PMBFX127	9	12,5	9	77	11,69%
PMBFX127	9	12,5	8	74	10,81%
PMBFX127	9	12,5	14	86	16,28%
PMBFX147	9	12,5	77	97	79,38%
PMBFX147	9	12,5	85	104	81,73%
PMBFX147	9	12,5	71	90	78,89%
PMBFX147	9	12,5	68	94	72,34%
PMBCDC4	9	12,5	49	67	73,13%
PMBCDC4	9	12,5	44	58	75,86%
PMBCDC4	9	12,5	51	64	79,69%
PMBCDC4	9	12,5	51	69	73,91%
PMBCDC14	9	12,5	7	127	5,51%
PMBCDC14	9	12,5	3	104	2,88%
PMBCDC14	9	12,5	2	97	2,06%
PMBCDC14	9	12,5	3	113	2,65%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBCDC34	9	12,5	29	39	74,36%
PMBCDC34	9	12,5	55	66	83,33%
PMBCDC34	9	12,5	51	63	80,95%
PMBCDC34	9	12,5	49	57	85,96%
PMBCDC61	9	12,5	50	111	45,05%
PMBCDC61	9	12,5	51	104	49,04%
PMBCDC61	9	12,5	47	97	48,45%
PMBCDC61	9	12,5	48	112	42,86%
PMBCDC104	9	12,5	84	121	69,42%
PMBCDC104	9	12,5	71	98	72,45%
PMBCDC104	9	12,5	68	101	67,33%
PMBCDC104	9	12,5	79	123	64,23%
PMBCDC124	9	12,5	54	98	55,10%
PMBCDC124	9	12,5	45	75	60,00%
PMBCDC124	9	12,5	62	93	66,67%
PMBCDC124	9	12,5	46	77	59,74%
PMBMDF1	9	12,5	48	62	77,42%
PMBMDF1	9	12,5	56	69	81,16%
PMBMDF1	9	12,5	77	97	79,38%
PMBMDF1	9	12,5	42	54	77,78%
PMBMDF12	9	12,5	0	115	0,00%
PMBMDF12	9	12,5	0	98	0,00%
PMBMDF12	9	12,5	0	107	0,00%
PMBMDF12	9	12,5	0	120	0,00%
PMBMDF31	9	12,5	99	129	76,74%
PMBMDF31	9	12,5	77	102	75,49%
PMBMDF31	9	12,5	75	94	79,79%
PMBMDF31	9	12,5	81	99	81,82%
PMBMDF36	9	12,5	1	97	1,03%
PMBMDF36	9	12,5	0	85	0,00%
PMBMDF36	9	12,5	2	108	1,85%
PMBMDF36	9	12,5	2	111	1,80%
PMBMDF38	9	12,5	38	49	77,55%
PMBMDF38	9	12,5	35	53	66,04%
PMBMDF38	9	12,5	43	67	64,18%
PMBMDF38	9	12,5	41	59	69,49%
PMBMDF49	9	12,5	0	53	0,00%
PMBMDF49	9	12,5	0	68	0,00%
PMBMDF49	9	12,5	0	59	0,00%
PMBMDF49	9	12,5	0	65	0,00%
PMBMDF54	9	12,5	33	43	76,74%
PMBMDF54	9	12,5	49	62	79,03%
PMBMDF54	9	12,5	44	56	78,57%
PMBMDF54	9	12,5	37	51	72,55%
PMBMDF71	9	12,5	59	79	74,68%
PMBMDF71	9	12,5	45	65	69,23%
PMBMDF71	9	12,5	66	87	75,86%
PMBMDF71	9	12,5	64	89	71,91%
PMBMDF87	9	12,5	0	102	0,00%
PMBMDF87	9	12,5	0	115	0,00%
PMBMDF87	9	12,5	0	95	0,00%
PMBMDF87	9	12,5	0	101	0,00%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBMDF91	9	12,5	38	63	60,32%
PMBMDF91	9	12,5	47	74	63,51%
PMBMDF91	9	12,5	39	66	59,09%
PMBMDF91	9	12,5	52	78	66,67%
PMBMDF92	9	12,5	0	78	0,00%
PMBMDF92	9	12,5	0	93	0,00%
PMBMDF92	9	12,5	0	66	0,00%
PMBMDF92	9	12,5	0	62	0,00%
PMBCDC26	9	12,5	0	75	0,00%
PMBCDC26	9	12,5	0	68	0,00%
PMBCDC26	9	12,5	0	60	0,00%
PMBCDC26	9	12,5	0	95	0,00%
Controle	10	12,5	67	80	83,75%
Controle	10	12,5	74	88	84,09%
Controle	10	12,5	82	104	78,85%
Controle	10	12,5	86	97	88,66%
PMBFX28	10	12,5	0	102	0,00%
PMBFX28	10	12,5	0	117	0,00%
PMBFX28	10	12,5	0	97	0,00%
PMBFX28	10	12,5	0	115	0,00%
PMBFX55	10	12,5	21	41	51,22%
PMBFX55	10	12,5	32	68	47,06%
PMBFX55	10	12,5	27	49	55,10%
PMBFX55	10	12,5	27	53	50,94%
PMBFX56	10	12,5	0	110	0,00%
PMBFX56	10	12,5	0	121	0,00%
PMBFX56	10	12,5	0	98	0,00%
PMBFX56	10	12,5	0	114	0,00%
Controle	11	12,5	56	79	70,89%
Controle	11	12,5	32	48	66,67%
Controle	11	12,5	39	55	70,91%
Controle	11	12,5	42	57	73,68%
PMBMDF89	11	12,5	0	42	0,00%
PMBMDF89	11	12,5	0	54	0,00%
PMBMDF89	11	12,5	0	58	0,00%
PMBMDF89	11	12,5	0	55	0,00%
PMBMDF77	11	12,5	0	53	0,00%
PMBMDF77	11	12,5	0	64	0,00%
PMBMDF77	11	12,5	0	70	7,00%
PMBMDF77	11	12,5	0	66	0,00%
PMBCDC86	11	12,5	0	72	0,00%
PMBCDC86	11	12,5	0	45	0,00%
PMBCDC86	11	12,5	0	58	0,00%
PMBCDC86	11	12,5	0	55	0,00%
PMBCDC85	11	12,5	44	89	49,44%
PMBCDC85	11	12,5	53	105	50,48%
PMBCDC85	11	12,5	29	56	51,79%
PMBCDC85	11	12,5	47	97	48,45%
PMBFX45	11	12,5	0	93	0,00%
PMBFX45	11	12,5	0	64	0,00%
PMBFX45	11	12,5	0	86	0,00%
PMBFX45	11	12,5	0	78	0,00%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX52	11	12,5	46	58	79,31%
PMBFX52	11	12,5	30	45	66,67%
PMBFX52	11	12,5	47	61	77,05%
PMBFX52	11	12,5	39	55	70,91%
PMBFX90	11	12,5	37	65	56,92%
PMBFX90	11	12,5	35	73	47,95%
PMBFX90	11	12,5	28	53	52,83%
PMBFX90	11	12,5	35	62	56,45%
PMBFX92	11	12,5	0	46	0,00%
PMBFX92	11	12,5	0	49	0,00%
PMBFX92	11	12,5	0	44	0,00%
PMBFX92	11	12,5	0	47	0,00%
Controle	12	50	40	53	75,47%
Controle	12	50	43	59	72,88%
Controle	12	50	47	68	69,12%
Controle	12	50	39	54	72,22%
PMBFX2	12	50	54	75	72,00%
PMBFX2	12	50	50	68	73,53%
PMBFX2	12	50	34	53	64,15%
PMBFX2	12	50	51	70	72,86%
PMBFX28	12	50	0	49	0,00%
PMBFX28	12	50	0	36	0,00%
PMBFX28	12	50	0	56	0,00%
PMBFX28	12	50	0	44	0,00%
PMBFX56	12	50	0	67	0,00%
PMBFX56	12	50	0	53	0,00%
PMBFX56	12	50	0	60	0,00%
PMBFX56	12	50	0	62	0,00%
PMBFX81	12	50	32	63	50,79%
PMBFX81	12	50	37	64	57,81%
PMBFX81	12	50	28	53	52,83%
PMBFX81	12	50	31	63	49,21%
PMBCDC85	12	50	0	79	0,00%
PMBCDC85	12	50	0	86	0,00%
PMBCDC85	12	50	0	72	0,00%
PMBCDC85	12	50	0	77	0,00%
Controle	13	50	60	79	75,95%
Controle	13	50	64	85	75,29%
Controle	13	50	46	64	71,88%
Controle	13	50	64	82	78,05%
PMBFX32	13	50	0	56	0,00%
PMBFX32	13	50	0	68	0,00%
PMBFX32	13	50	0	75	0,00%
PMBFX32	13	50	0	61	0,00%
PMBFX63	13	50	2	65	3,08%
PMBFX63	13	50	5	45	11,11%
PMBFX63	13	50	5	53	9,43%
PMBFX63	13	50	6	78	7,69%
PMBFX116	13	50	0	65	0,00%
PMBFX116	13	50	0	97	0,00%
PMBFX116	13	50	0	79	0,00%
PMBFX116	13	50	0	68	0,00%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX127	13	50	1	80	1,25%
PMBFX127	13	50	0	93	0,00%
PMBFX127	13	50	0	77	0,00%
PMBFX127	13	50	1	91	1,10%
PMBFX146	13	50	55	86	63,95%
PMBFX146	13	50	50	75	66,67%
PMBFX146	13	50	46	68	67,65%
PMBFX146	13	50	49	71	69,01%
PMBFX147	13	50	0	72	0,00%
PMBFX147	13	50	0	78	0,00%
PMBFX147	13	50	0	68	0,00%
PMBFX147	13	50	0	93	0,00%
PMBFX155	13	50	31	35	88,57%
PMBFX155	13	50	38	46	82,61%
PMBFX155	13	50	27	32	84,38%
PMBFX155	13	50	33	38	86,84%
PMBFX187	13	50	35	55	63,64%
PMBFX187	13	50	47	82	57,32%
PMBFX187	13	50	41	74	55,41%
PMBFX187	13	50	41	69	59,42%
PMBFX189	13	50	32	77	41,56%
PMBFX189	13	50	28	74	37,84%
PMBFX189	13	50	28	71	39,44%
PMBFX189	13	50	34	86	39,53%
PMBCDC34	13	50	0	48	0,00%
PMBCDC34	13	50	0	52	0,00%
PMBCDC34	13	50	0	49	0,00%
PMBCDC34	13	50	0	75	0,00%
Controle	14	50	87	97	89,69%
Controle	14	50	71	79	89,87%
Controle	14	50	89	101	88,12%
Controle	14	50	78	86	90,70%
PMBFX45	14	50	0	101	0,00%
PMBFX45	14	50	0	94	0,00%
PMBFX45	14	50	0	85	0,00%
PMBFX45	14	50	0	99	0,00%
PMBFX52	14	50	0	85	0,00%
PMBFX52	14	50	0	73	0,00%
PMBFX52	14	50	0	90	0,00%
PMBFX52	14	50	0	97	0,00%
PMBFX90	14	50	1	74	1,35%
PMBFX90	14	50	1	88	1,14%
PMBFX90	14	50	0	67	0,00%
PMBFX90	14	50	2	93	2,15%
PMBFX92	14	50	0	98	0,00%
PMBFX92	14	50	0	74	0,00%
PMBFX92	14	50	0	93	0,00%
PMBFX92	14	50	0	85	0,00%
PMBCDC26	14	50	0	105	0,00%
PMBCDC26	14	50	0	97	0,00%
PMBCDC26	14	50	0	81	0,00%
PMBCDC26	14	50	0	111	0,00%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBCDC86	14	50	0	88	0,00%
PMBCDC86	14	50	0	81	0,00%
PMBCDC86	14	50	0	96	0,00%
PMBCDC86	14	50	0	83	0,00%
PMBMDF1	14	50	17	89	19,10%
PMBMDF1	14	50	11	81	13,58%
PMBMDF1	14	50	12	76	15,79%
PMBMDF1	14	50	15	87	17,24%
PMBMDF71	14	50	9	84	10,71%
PMBMDF71	14	50	1	59	1,69%
PMBMDF71	14	50	5	71	7,04%
PMBMDF71	14	50	5	68	7,35%
PMBMDF77	14	50	0	65	0,00%
PMBMDF77	14	50	0	76	0,00%
PMBMDF77	14	50	0	64	0,00%
PMBMDF77	14	50	0	96	0,00%
PMBMDF89	14	50	11	76	14,47%
PMBMDF89	14	50	9	59	15,25%
PMBMDF89	14	50	5	53	9,43%
PMBMDF89	14	50	8	61	13,11%
PMBMDF92	14	50	0	83	0,00%
PMBMDF92	14	50	0	98	0,00%
PMBMDF92	14	50	0	103	0,00%
PMBMDF92	14	50	0	85	0,00%
Controle	15	50	44	64	68,75%
Controle	15	50	37	54	68,52%
Controle	15	50	30	46	65,22%
Controle	15	50	44	58	75,86%
PMBFX55	15	50	3	48	6,25%
PMBFX55	15	50	5	56	8,93%
PMBFX55	15	50	1	34	2,94%
PMBFX55	15	50	3	44	6,82%
Controle	16	50	65	70	92,86%
Controle	16	50	75	81	92,59%
Controle	16	50	78	89	87,64%
Controle	16	50	59	62	95,16%
PMBCDC4	16	50	7	74	9,46%
PMBCDC4	16	50	6	73	8,22%
PMBCDC4	16	50	5	67	7,46%
PMBCDC4	16	50	7	62	11,29%
PMBCDC43	16	50	74	87	85,06%
PMBCDC43	16	50	97	119	81,51%
PMBCDC43	16	50	72	90	80,00%
PMBCDC43	16	50	82	95	86,32%
PMBCDC50	16	50	83	84	98,81%
PMBCDC50	16	50	75	75	100,00%
PMBCDC50	16	50	68	69	98,55%
PMBCDC50	16	50	77	77	100,00%
PMBCDC116	16	50	96	97	98,97%
PMBCDC116	16	50	104	106	98,11%
PMBCDC116	16	50	96	97	98,97%
PMBCDC116	16	50	96	96	100,00%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBCDC124	16	50	0	98	0,00%
PMBCDC124	16	50	0	101	0,00%
PMBCDC124	16	50	0	87	0,00%
PMBCDC124	16	50	0	95	0,00%
PMBMDF78	16	50	41	88	46,59%
PMBMDF78	16	50	50	103	48,54%
PMBMDF78	16	50	46	94	48,94%
PMBMDF78	16	50	39	86	45,35%
Controle	17	50	55	74	74,32%
Controle	17	50	52	76	68,42%
Controle	17	50	58	81	71,60%
Controle	17	50	57	79	72,15%
PMBCDC14	17	50	0	85	0,00%
PMBCDC14	17	50	0	94	0,00%
PMBCDC14	17	50	0	78	0,00%
PMBCDC14	17	50	0	91	0,00%
PMBMDF38	17	50	0	87	0,00%
PMBMDF38	17	50	0	93	0,00%
PMBMDF38	17	50	0	88	0,00%
PMBMDF38	17	50	0	99	0,00%
Controle	18	50	59	89	66,29%
Controle	18	50	54	77	70,13%
Controle	18	50	56	81	69,14%
Controle	18	50	63	87	72,41%
PMBCDC47	18	50	29	81	35,80%
PMBCDC47	18	50	31	85	36,47%
PMBCDC47	18	50	30	75	40,00%
PMBCDC47	18	50	35	82	42,68%
PMBCDC61	18	50	0	75	0,00%
PMBCDC61	18	50	0	83	0,00%
PMBCDC61	18	50	0	92	0,00%
PMBCDC61	18	50	0	68	0,00%
PMBCDC97	18	50	66	92	71,74%
PMBCDC97	18	50	45	69	65,22%
PMBCDC97	18	50	52	72	72,22%
PMBCDC97	18	50	49	73	67,12%
PMBCDC136	18	50	39	82	47,56%
PMBCDC136	18	50	45	99	45,45%
PMBCDC136	18	50	36	84	42,86%
PMBCDC136	18	50	42	91	46,15%
PMBMDF31	18	50	0	77	0,00%
PMBMDF31	18	50	0	84	0,00%
PMBMDF31	18	50	0	92	0,00%
PMBMDF31	18	50	0	87	0,00%
PMBMDF40	18	50	79	95	83,16%
PMBMDF40	18	50	63	77	81,82%
PMBMDF40	18	50	89	112	79,46%
PMBMDF40	18	50	64	77	83,12%
PMBMDF54	18	50	0	74	0,00%
PMBMDF54	18	50	0	96	0,00%
PMBMDF54	18	50	0	91	0,00%
PMBMDF54	18	50	0	86	0,00%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
Controle	19	50	58	67	86,57%
Controle	19	50	47	54	87,04%
Controle	19	50	46	57	80,70%
Controle	19	50	60	66	90,91%
PMBCDC104	19	50	0	69	0,00%
PMBCDC104	19	50	0	62	0,00%
PMBCDC104	19	50	0	79	0,00%
PMBCDC104	19	50	0	66	0,00%
PMBMDF12	19	50	0	45	0,00%
PMBMDF12	19	50	0	58	0,00%
PMBMDF12	19	50	0	63	0,00%
PMBMDF12	19	50	0	52	0,00%
PMBMDF36	19	50	4	64	6,25%
PMBMDF36	19	50	5	64	7,81%
PMBMDF36	19	50	4	49	8,16%
PMBMDF36	19	50	5	57	8,77%
PMBMDF49	19	50	2	47	4,26%
PMBMDF49	19	50	0	32	0,00%
PMBMDF49	19	50	2	50	4,00%
PMBMDF49	19	50	0	28	0,00%
PMBMDF87	19	50	0	99	0,00%
PMBMDF87	19	50	1	119	0,84%
PMBMDF87	19	50	0	89	0,00%
PMBMDF87	19	50	1	105	0,95%
PMBMDF91	19	50	0	97	0,00%
PMBMDF91	19	50	0	68	0,00%
PMBMDF91	19	50	0	93	0,00%
PMBMDF91	19	50	0	86	0,00%
Controle	20	12,5	57	75	76,00%
Controle	20	12,5	43	56	76,79%
Controle	20	12,5	65	86	75,58%
Controle	20	12,5	62	84	73,81%
PMBFX28	20	12,5	0	87	0,00%
PMBFX28	20	12,5	0	104	0,00%
PMBFX28	20	12,5	0	93	0,00%
PMBFX28	20	12,5	0	75	0,00%
PMBFX55	20	12,5	38	64	59,38%
PMBFX55	20	12,5	46	72	63,89%
PMBFX55	20	12,5	51	92	55,43%
PMBFX55	20	12,5	40	66	60,61%
PMBFX56	20	12,5	0	87	0,00%
PMBFX56	20	12,5	0	63	0,00%
PMBFX56	20	12,5	0	84	0,00%
PMBFX56	20	12,5	0	77	0,00%
Controle	21	12,5	77	97	79,38%
Controle	21	12,5	95	109	87,16%
Controle	21	12,5	72	88	81,82%
Controle	21	12,5	76	92	82,61%
PMBFX45	21	12,5	0	87	0,00%
PMBFX45	21	12,5	0	73	0,00%
PMBFX45	21	12,5	0	93	0,00%
PMBFX45	21	12,5	0	75	0,00%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMBFX90	21	12,5	45	66	68,18%
PMBFX90	21	12,5	32	45	71,11%
PMBFX90	21	12,5	40	57	70,18%
PMBFX90	21	12,5	37	53	69,81%
PMBFX92	21	12,5	0	94	0,00%
PMBFX92	21	12,5	0	79	0,00%
PMBFX92	21	12,5	0	86	0,00%
PMBFX92	21	12,5	0	99	0,00%
PMBCDC85	21	12,5	27	39	69,23%
PMBCDC85	21	12,5	46	63	73,02%
PMBCDC85	21	12,5	34	54	62,96%
PMBCDC85	21	12,5	31	48	64,58%
PMBCDC86	21	12,5	0	47	0,00%
PMBCDC86	21	12,5	0	42	0,00%
PMBCDC86	21	12,5	0	38	0,00%
PMBCDC86	21	12,5	0	51	0,00%
PMBMDF77	21	12,5	6	84	7,14%
PMBMDF77	21	12,5	1	41	2,44%
PMBMDF77	21	12,5	3	67	4,48%
PMBMDF77	21	12,5	6	72	8,33%
PMBMDF79	21	12,5	0	47	0,00%
PMBMDF79	21	12,5	0	58	0,00%
PMBMDF79	21	12,5	0	63	0,00%
PMBMDF79	21	12,5	0	55	0,00%
Controle	22	12,5	50	60	83,33%
Controle	22	12,5	43	50	86,00%
Controle	22	12,5	42	52	80,77%
Controle	22	12,5	47	57	82,46%
PMBFX63	22	12,5	54	71	76,06%
PMBFX63	22	12,5	41	60	68,33%
PMBFX63	22	12,5	55	78	70,51%
PMBFX63	22	12,5	52	70	74,29%
PMBFX116	22	12,5	56	93	60,22%
PMBFX116	22	12,5	40	74	54,05%
PMBFX116	22	12,5	27	50	54,00%
PMBFX116	22	12,5	43	77	55,84%
PMBFX127	22	12,5	5	59	8,47%
PMBFX127	22	12,5	6	60	10,00%
PMBFX127	22	12,5	7	55	12,73%
PMBFX127	22	12,5	6	62	9,68%
PMBCDC14	22	12,5	0	67	0,00%
PMBCDC14	22	12,5	0	87	0,00%
PMBCDC14	22	12,5	0	59	0,00%
PMBCDC14	22	12,5	0	88	0,00%
PMBCDC26	22	12,5	0	103	0,00%
PMBCDC26	22	12,5	0	65	0,00%
PMBCDC26	22	12,5	0	98	0,00%
PMBCDC26	22	12,5	0	67	0,00%
PMBCDC61	22	12,5	55	94	58,51%
PMBCDC61	22	12,5	39	71	54,93%
PMBCDC61	22	12,5	37	72	51,39%
PMBCDC61	22	12,5	44	79	55,70%

(continuação Apêndice C)

CONTROLE/ISOLADO	Ensaio	Concentração (%)	Conídios germinados	Total de conídios	% germinação
PMB CDC124	22	12,5	24	43	55,81%
PMB CDC124	22	12,5	33	58	56,90%
PMB CDC124	22	12,5	19	39	48,72%
PMB CDC124	22	12,5	23	45	51,11%
PMB MDF12	22	12,5	0	71	0,00%
PMB MDF12	22	12,5	0	53	0,00%
PMB MDF12	22	12,5	0	65	0,00%
PMB MDF12	22	12,5	0	58	0,00%
PMB MDF36	22	12,5	0	88	0,00%
PMB MDF36	22	12,5	0	68	0,00%
PMB MDF36	22	12,5	0	57	0,00%
PMB MDF36	22	12,5	0	63	0,00%
PMB MDF38	22	12,5	77	92	83,70%
PMB MDF38	22	12,5	38	56	67,86%
PMB MDF38	22	12,5	66	87	75,86%
PMB MDF38	22	12,5	51	68	75,00%
PMB MDF49	22	12,5	0	65	0,00%
PMB MDF49	22	12,5	0	69	0,00%
PMB MDF49	22	12,5	0	57	0,00%
PMB MDF49	22	12,5	0	84	0,00%
PMB MDF87	22	12,5	0	81	0,00%
PMB MDF87	22	12,5	0	70	0,00%
PMB MDF87	22	12,5	0	78	0,00%
PMB MDF87	22	12,5	0	87	0,00%
PMB MDF91	22	12,5	30	53	56,60%
PMB MDF91	22	12,5	38	66	57,58%
PMB MDF91	22	12,5	23	42	54,76%
PMB MDF91	22	12,5	34	57	59,65%
PMB MDF92	22	12,5	0	78	0,00%
PMB MDF92	22	12,5	0	64	0,00%
PMB MDF92	22	12,5	0	53	0,00%
PMB MDF92	22	12,5	0	74	0,00%